



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**DISTRIBUIÇÃO NUCLEAR, DINÂMICA E FUNÇÃO DAS
TOPOISOMERASES I, II α E II β NA REPLICAÇÃO
DE GENOMAS**

-Estudo experimental no Adenovírus serótipo 2-

Fernando António da Costa Ferreira

TESE DE DOUTORAMENTO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Rui Manuel V. Horta Caldeira

Doutora Maria do Carmo S. V. R. Fonseca

Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira

Doutor João A. Augusto Ferreira

Doutor José António Mestre Prates

Doutor António José Freitas Duarte

Doutor João José Martins Afonso

ORIENTADOR

Doutor João A. Augusto Ferreira

CO-ORIENTADORA

Doutora Maria de Carmo S. V. R. Fonseca

2008

LISBOA

RESUMO

Neste trabalho foi estudado o papel das topoisomerases celulares (I, II α e II β) na replicação, usando os adenovírus como modelo. Os adenovírus apresentam um genoma de ADN de cadeia dupla e são responsáveis por infecções respiratórias, gastro-intestinais, oftalmológicas, neurológicas e genito-urinárias. São organismos ubíquos, infectam passáros e a maioria dos mamíferos, incluindo o Homem. Com efeito, a importância destes vírus tem vindo a aumentar por surgirem associados a novos quadros nosológicos (imunodeficiências, transplantes de órgãos) e por poderem vir a funcionar como vectores terapêuticos em doenças genéticas e na viroterapia do cancro. No presente trabalho (1) analisámos a distribuição das topoisomerases I, II α e II β no núcleo de células infectadas, com utilização de tecnologias modernas de microscopia, (2) caracterizámos funcionalmente os locais de acumulação destas enzimas, (3) testámos se a replicação e a transcrição virais eram necessárias ao seu recrutamento, (4) estudámos a dinâmica das topoisomerases I e II α *in vivo* por FRAP, (5) realizámos a análise mutacional da topoisomerase I e (6) quantificámos as concentrações e actividades catalíticas das topoisomerases antes e depois da infecção. Por fim, (7) abordámos a conexão funcional entre estas proteínas celulares e a replicação do vírus por depleção selectiva de cada topoisomerase (*siRNA*), evitando os efeitos genotóxicos dos fármacos anti-topoisomerase.

Os resultados obtidos permitem concluir que ambos os tipos de topoisomerases (I e II) são utilizados pelo adenovírus durante a sua replicação, mas que o seu papel é diferencial, com relevo inesperado para as topoisomerases II α e II β . Estes resultados sugerem que as topoisomerases poderão ser potenciais alvos na terapêutica de patologias infecciosas e potenciais factores preditivos na terapêutica viral do cancro.

Palavras-chave: topoisomerases celulares; adenovírus; replicação genómica; cancro.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the contribution of cellular topoisomerases (I, II α and II β) in replication using adenovirus as a model. Adenovirus are non-enveloped virus with a double stranded DNA genome that are associated with respiratory tract diseases, but can also cause gastrointestinal, ophthalmological, neurological and genitourinary problems. Widespread in nature, infecting birds, many mammals and man, although most adenoviral diseases are self-limiting, fatal invasive disease may occur in immunocompromised or transplanted patients and occasionally in healthy adults. Much of the current interest in adenovirus is related with their development as vaccine/gene delivery vehicles and as a tool in oncolytic virotherapy against cancer. Initially, we addressed (1) whether cellular topoisomerases (I, II α and II β) are redistributed within the nuclei of infected cells. Having established that three enzymes are recruited to viral factories, subsequently we tested (2) whether these correspond to sites of privileged catalytic activity, (3) if ongoing viral replication and transcription are required for the targeting of three topoisomerases, (4) followed the dynamics of topoisomerase I and II α , (5) analyzed the protein domain requirements for the targeting of topoisomerase I to factories, and (6) quantified concentrations and catalytic activities of topoisomerases before/after infection. Finally, (7) we addressed the functional connection between topoisomerases and adenovirus replication by using siRNA technology to lower, selectively, the protein levels of three proteins to avoid undesired side effects of currently used topoisomerase inhibitors and poisons.

Our results provided a strong evidence for a major role of topoisomerases type II during replication of adenoviral genome, suggesting that isoform α β can be used as potential targets in infectious pathology and as predictive factors of virotherapy in cancer.

Keywords: cellular topoisomerases; adenovirus; genome replication; cancer.

Aos meus pais e à Ana.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor João António Augusto Ferreira é devido o meu sincero agradecimento pela orientação desta Dissertação, à qual dedicou um empenho inexcedível, desde o momento em que sugeriu o tema do trabalho até aos momentos finais da sua redacção. Os seus conselhos, as suas críticas, o seu entusiasmo, a sua energia e o seu exemplo diário tiveram e, por certo, continuarão a ter, um papel fundamental na minha formação científica e pessoal. Finalmente, pela sua amizade.

À Professora Doutora Maria do Carmo Fonseca quero agradecer a sua co-orientação e apoio e manifestar-lhe a minha gratidão pela forma generosa com que me acolheu no Instituto de Histologia e Embriologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Lisboa (FM/UL). Foi neste local e, mais tarde, no Instituto de Medicina Molecular que desenvolvi o meu trabalho experimental, num ambiente ímpar, onde a qualidade e rigor científico são presença constante.

À Professora Doutora Maria da Conceição Peleteiro manifesto, muito reconhecidamente, o meu sincero agradecimento pela disponibilidade demonstrada e o pelo seu inestimável apoio e empenho no cumprimento das funções de Tutora.

Ao Professor William Beck da Faculdade de Medicina, da Universidade de Illinois, agradeço o fornecimento de um vector recombinante clonado com o cADN da topoisomerase II α utilizado nos estudos de FRAP.

Aos meus colegas de laboratório, que no dia-a-dia partilharam os bons e os maus momentos, um profundo agradecimento. O apoio e ajuda que sempre existiu, fortaleceram os laços de amizade que espero saber cuidar. Ao Soren Steffensen, à Vera Santos, à Célia Carvalho, à Marta Agostinho, à Inês Pinheiro e à Sandra Ferreira, o meu obrigado.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV/UTL), e em particular à secção de Anatomia e ao Professor Doutor João José Martins Afonso, a excelente coordenação do serviço docente que facilitou a realização da parte experimental do meu Doutoramento numa instituição externa.

Por fim, desejo expressar um agradecimento especial ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA/FMV) o apoio concedido na participação em congressos e cursos de pós-graduação.

PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

Alguns dos resultados experimentais obtidos durante os trabalhos práticos de doutoramento foram publicados nos seguintes periódicos:

1. AGOSTINHO, M., RINO, J., BRAGA, J., FERREIRA, F. & FERREIRA, J. (2002) - Human topoisomerase II α : Subcellular pools and regulation by replication and deacetylase activities. *Meeting on Dynamic Organization of Nuclear Function*, pág.: 23. Organizado por Cold Spring Harbor Laboratory. Decorreu em Nova Iorque, nos Estados Unidos da América, nos dias 18-22 de Setembro. Comunicação em painel.
2. FERREIRA, F., AGOSTINHO, M. & FERREIRA, J. (2003) - Ensaio microscópico para screening de actividade topoisomérica. *Reunião da Sociedade Portuguesa de Biologia*, pág: 4. Organizado pela Sociedade Portuguesa de Biologia, no Instituto de Investigação Científica Bento da Rocha Cabral. Decorreu em Lisboa, no dia 19 de Novembro. Comunicação oral.
3. FERREIRA, F., STEFFENSEN, S., AGOSTINHO, M., BRAGA, J., FERNANDES, J. & FERREIRA, J. (2003) - Detecção e quantificação da actividade topoisomérica em sistemas biológicos – um novo método. Livro de resumos da *XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica e Biologia Celular*, pág.:12. Organizado pela Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica e Biologia Celular e pela Universidade dos Açores. Decorreu em Ponta Delgada, nos Açores, nos dias 5-7 de Dezembro. Comunicação oral.
4. AGOSTINHO, M., RINO, J., BRAGA, J., FERREIRA, F. & FERREIRA, J. (2003) – Human topoisomerase II α : Targeting to subchromosomal sites of activity during interphase and mitosis”. Livro de resumos da *XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica e Biologia Celular*, pág.: 36. Organizado pela Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica e Biologia Celular e pela Universidade dos Açores. Decorreu em Ponta Delgada, nos Açores, nos dias 5-7 de Dezembro. Comunicação em painel.

5. STEFFENSEN, S., FERREIRA, F., RINO, J., BRAGA, J., AGOSTINHO, M. & FERREIRA, J. (2004) - Localization and dynamics of cellular topoisomerases at sites of adenoviral replication and transcription". Book of abstracts of *Dynamic Organization of Nuclear Function*, pág.: 147. Organizado por Cold Spring Harbor Laboratory. Decorreu em Nova Iorque, nos Estados Unidos da América, nos dias 29 de Setembro a 3 de Outubro. Comunicação em painel.
6. AGOSTINHO, M., RINO, J., BRAGA, J., FERREIRA, F., STEFFENSEN, S. & FERREIRA, J. (2004) - Human topoisomerase II α : targeting to subchromosomal sites of activity during interphase and mitosis. *Molecular Biology of the Cell* **15**(5): 2388-2400. PMID: 14978217.
7. FERREIRA, F., STEFFENSEN, S., BRAGA, J., RINO, J., COSTA, R., AGOSTINHO, M. & FERREIRA, J. (2004) - Distribution and dynamics of topoisomerase I and II α in the nucleus of Adenovirus infected HeLa cells. Abstract book of *FEBS Course on Advance Light Microscopy and 5th International Meeting of European Light Microscopy Initiative*, pág.: 93. Decorreu em Semmering, na Áustria, nos dias 31 Maio a 3 de Junho. Comunicação em painel.
8. FERREIRA, F., STEFFENSEN, S., BRAGA, J., RINO, J., AGOSTINHO, M. & FERREIRA, J. (2004) - Importância das topoisomerases I e II α na progressão da infecção adenoviral em células de mamífero". *XXXIX Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica e Biologia Celular*, pág.: 37-38. Decorreu em Aveiro, Portugal, nos dias 4-6 Novembro. Comunicação oral.
9. AGOSTINHO, M., STEFFENSEN, S., FERREIRA, F., RINO, J., BRAGA, J. & FERREIRA, J. (2005) - Targeting of cellular topoisomerase activities during adenoviral infection. Livro de resumos da *ELSO meeting 2005: Frontiers of cellular, developmental and molecular biology*, pág.: 54. Organizado por European Life Scientist Organization. Decorreu em Dresden, na Alemanha, nos dias 3-6 Setembro. Comunicação em painel.

10. STEFFENSEN, S., FERREIRA, F., RINO, J., BRAGA, J., COSTA, R., AGOSTINHO M. & FERREIRA, J. (2005) - Human topoisomerases: Localization, dynamics and role at nuclear sites of adenoviral replication. Livro de resumos da *EMBO/FEBS Conference on Nuclear Structure and Dynamics*, pág.: 40. Organizado por The European Molecular Biology Organization e European Life Scientist Organization. Decorreu em La Grande Motte, na França, nos dias 24-28 de Setembro. Comunicação em painel.
11. FERREIRA, F., RINO, J., BRAGA, J., COSTA, R. & FERREIRA, J. (2006) - Dynamics and role of human topoisomerases at nuclear sites of adenoviral replication. Livro de resumos do *Meeting on Dynamic Organization of Nuclear Function*, pág.: 48. Organização do Cold Spring Harbor Laboratory. Decorreu em Nova Iorque, nos Estados Unidos da América, nos dias 27 de Setembro a 1 de Outubro. Comunicação em painel.
12. AGOSTINHO, M., RINO J., BRAGA J., SANTOS, V., FERREIRA, F. & FERREIRA, J. (2006) - Dynamics of topoisomerase 2 α conjugation with SUMO-1 and SUMO-2/3 during interphase and mitosis. Livro de resumos do *Meeting on Dynamic Organization of Nuclear Function*, pág.: 200. Organização do Cold Spring Harbor Laboratory. Decorreu em Nova Iorque, nos Estados Unidos da América, nos dias 27 de Setembro a 1 de Outubro. Comunicação oral.
13. FERREIRA, F., STEFFENSEN, S., BRAGA, J., AGOSTINHO, M., BECK, W. & FERREIRA, F. (2007) – Role of cellular topoisomerases in morphofunctional organization of foreign genomes inside the mammalian cell. *Jornadas do Ensino Pós-Graduado da FMV e Simpósio do CIISA*, pág.:14. Organizado pela comissão de pós-graduação do Conselho Científico da FMV e pelo coordenador do CIISA. Decorreu em Lisboa, nos dias 14 e 15 de Junho. Comunicação oral.
14. FERREIRA, F., STEFFENSEN, S., RINO, J., COSTA, R., SANTOS, V., AGOSTINHO, M., BECK, W. & FERREIRA, F. – Function and dynamics of cellular topoisomerases during adenoviral replication (artigo em preparação).

PROJECTOS DE INVESTIGAÇÃO NO ÂMBITO DOS QUAIS O TRABALHO FOI REALIZADO

2001/05 - Cell biology of human topoisomerase II α (Fundação para a Ciência e a Tecnologia – Programa Operacional Ciência, Tecnologia e Inovação/BCI/36194/2000).

2005/07 - Topoisomerases: at the border between DNA replication and chromatin structure (Fundação para a Ciência e a Tecnologia – Programa Operacional de Ciência e Inovação/BIA-BCM/63368/2004).

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS, DE SIGLAS E DE UNIDADES	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
<i>I.1. Topoisomerasas celulares</i>	<i>3</i>
I.1.1. Topoisomerase I	5
I.1.2. Topoisomerasas tipo II	7
I.1.2.1. Topoisomerase II α	8
I.1.2.2. Topoisomerase II β	9
<i>I.2. Replicação do ADN em células de mamífero</i>	<i>10</i>
I.2.1. Complexo de pré-replicação - componentes e regulação	13
I.2.2. Anatomia da forquilha de replicação	15
I.2.3. Papel das topoisomerasas na forquilha de replicação	17
<i>I.3. Adenovírus</i>	<i>19</i>
I.3.1. Organização do genoma adenoviral	20
I.3.2. Replicação do genoma viral	21
I.3.3. Papel das topoisomerasas na replicação do adenovírus	24
<i>I.4. Objectivos da investigação</i>	<i>26</i>
II. MATERIAL E MÉTODOS	27
II.1. Anticorpos e drogas	28
II.2. Cultura de células, infecção viral e microinjecção celular	29
II.3. Microscopia e análise de imagem	30
II.4. Técnica de <i>Western Blot</i>	31
II.5. Construção e expressão de proteínas de fusão	32
II.6. Técnica de silenciamento proteico por RNA de interferência (<i>RNAi</i>)	34
II.7. “ <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> ” (<i>FRAP</i>) e análise de imagem....	35
II.8. Electroforese de campo-pulsado em gel (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> – <i>PFGE</i>)	36

III. RESULTADOS	38
III.1. As topoisomerases I, II α e II β são recrutadas para os locais de replicação e de transcrição do adenovírus	39
III.2. A mobilidade das topoisomerases I e II α é reduzida significativamente junto às fábricas adenovirais	47
III.3. A actividade catalítica e o domínio N-terminal da topoisomerase I são essenciais para o recrutamento <i>in vivo</i>	52
III.4. As concentrações proteicas e as actividades catalíticas das topoisomerases I, II α e II β mantêm-se constantes durante a fase tardia da infecção.....	60
III.5. A depleção selectiva das topoisomerase I, II α e II β diminui a replicação do adenovírus	65
 IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	 70
IV.1. A replicação do adenovírus conduz a uma redistribuição intranuclear das Topoisomerases I, II α e II β	71
IV.2. A mobilidade das topoisomerases I e II α é reduzida significativamente junto às fábricas adenovirais	73
IV.3. A actividade catalítica e o domínio N-terminal da topoisomerase I são essenciais para o recrutamento <i>in vivo</i>	73
IV.4. As concentrações proteicas e as actividades catalíticas das topoisomerases I, II α e II β mantêm-se constantes durante a fase tardia da infecção	75
IV.5. A depleção selectiva das topoisomerase I, II α e II β diminui a replicação do adenovírus	75
IV.6. Perspectivas futuras	77
 V. BIBLIOGRAFIA	 79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Papel funcional da topoisomerase I durante a replicação celular	6
Figura 2 – Programa de replicação da cromatina em células de mamífero	12
Figura 3 – Papel funcional das topoisomerases celulares junto às forquilhas de replicação	18
Figura 4 – Modelo da replicação do ADN no adenovírus	22
Figura 5 – Representação esquemática da forquilha de replicação viral durante a fase de elongação	24
Figura 6 – Morfologia dos locais de replicação e de transcrição do adenovírus em células HeLa	40
Figura 7 – Os padrões de distribuição nuclear das topoisomerases I e II α mudam de forma dramática em células HeLa infectadas com adenovírus	41
Figura 8 – Redistribuição das topoisomerases I e II α durante a fase tardia da infecção em células HeLa	42
Figura 9 – Padrões de distribuição da topoisomerase II β durante a fase tardia da infecção em células HeLa	43
Figura 10 – As topoisomerases I e II α co-localizam parcialmente com os sítios de replicação do adenovírus	44
Figura 11 – As topoisomerases I e II α co-localizam com os sítios de transcrição viral	45
Figura 12 – As acumulações das topoisomerases I, II α e II β junto às fábricas virais são formadas por populações moleculares cataliticamente activas	46
Figura 13 – Cinética das proteínas de fusão GFP-Topo I ^{wt} , GFP-Topo I ^{Y723F} e GFP-Topo II α ^{wt} em células HeLa infectadas pelo adenovírus e analisadas 16 horas após infecção	50
Figura 14 – Imagens de <i>FRAP</i> e curvas de recuperação de fluorescência das duas proteínas de fusão usadas como controlo: a proteína GFP como proteína livre e a GFP-Topo I ^{wt} como proteína imóvel após a sua fixação pelo formol	51
Figura 15 – Representação esquemática das proteínas de fusão usadas na análise mutacional da topoisomerase I	56
Figura 16 – Níveis de expressão das proteínas EGFP-Topo I detectados pela técnica de <i>Western Blot</i>	57

Figura 17 – Localização intranuclear das proteínas GFP-Topo I ^{wt} , GFP-Topo I ^{Y723F} , GFP-Topo I ^{Δ1-138} e GFP-Topo I ^{Δ1-209} , em células HeLa infectadas pelo adenovírus..	58
Figura 18 – Localização intranuclear das proteínas GFP-Topo I ^{1-210wt} e GFP-Topo I ^{1-210-3K'R} em células HeLa infectadas pelo adenovírus	59
Figura 19 – Co-localização da proteína GFP-Topo I ^{1-210-3K'R} com os <i>speckles</i> em células HeLa não infectadas	59
Figura 20 – As concentrações proteicas das topoisomerasas I, IIα e IIβ não variam durante a infecção adenoviral	62
Figura 21 – As actividades globais da topoisomerase I e das topoisomerasas de tipo II não são alteradas pela infecção adenoviral	64
Figura 22 – Controlo da eficiência de depleção da topoisomerase I, IIα e IIβ em células HeLa pela técnica de <i>Western blot</i>	66
Figura 23 – A depleção isolada de topoisomerase I, IIα e IIβ reduz o número e o tamanho das fábricas virais	67
Figura 24 – A depleção selectiva das topoisomerasas celulares, em particular da topoisomerase IIβ, reduz o número de genomas virais replicantes	68
Figura 25 – Quantidades relativas de ADN viral presente às 10 horas e às 16 horas após a infecção	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Classificação das topoisomerases celulares com base nas suas propriedades funcionais e estruturais	4
Tabela II – Classificação dos membros que compõem a família <i>Adenoviridae</i>	20
Tabela III – Sequências de oligonucleótidos efectivas e de controlo usadas no silenciamento das topoisomerases I, II α e II β	35

ÍNDICE DE ABREVIATURAS, DE SIGLAS E DE UNIDADES

- A - Adenosina;
- Ad2 - Adenovírus serótipo 2;
- ADN - ácido desoxirribonucleico;
- AraC - 1-(β -D-arabinofuranosil)citosina;
- ARN - ácido ribonucleico;
- ARNm - ácido ribonucleico do tipo mensageiro;
- ARS - *Autonomously Replicating Sequence* / sequência de replicação autônoma;
- ATCC - *American Type Culture Collection* / coleção de culturas celulares americana;
- ATP - Adenosina trifosfato;
- AT - bases nitrogenadas adenina e timina;
- BrdU - 5-bromo-2-deoxi-uridina;
- C - Citosina;
- CAD - *Carbamoyl-phosphate synthetase 2, Aspartate transcarbamylase and Dihydroorotase*;
- Cdc6 - *Cell division cycle 6*;
- Cdk2 - *Cyclin-dependent kinase 2* / cinase 2 dependente da ciclina;
- cADN - ácido desoxirribonucleico complementar ao ácido ribonucleico;
- Cdt1 - *Chromatin licensing and DNA replication factor 1*;
- CPT - Camptotecina;
- Cy5 - marcador fluorescente da família da cianina;
- D - *Diffusion coefficient* / coeficiente de difusão;
- DAPI - 4,6-diamidino-2-fenilindol;
- DBP - *DNA-Binding Protein* / proteína ligante ao ADN;
- dCMP - *Deoxycytidine monophosphate* / monofosfato de desoxicitidina;
- DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*;
- DMSO - Dimetilsulfóxido;
- DNA - *Deoxyribonucleic acid*;
- DRB - 5,6- diclorobenzimidazol 1 β -D-ribofuranosido;
- DRT assay - *Differential Retention of Topoisomerase assay* / Ensaio de retenção diferencial da topoisomerase;

- E1, E2, E3 e E4 - *Early regions E1, E2, E3 e E4* / regiões precoces E1, E2, E3 e E4;
- EC - *Enzyme Commission* / comissão de enzimas;
- EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic acid* / ácido etilenodiaminotetracético;
- EGTA - *Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid* / ácido etilenoglicol-di(éter β-aminoetílico)-N,N,N',N'-tetracético;
- ETOP - Etoposido;
- FITC - *Fluorescein isothiocyanate* / isotiocianato de fluoresceína;
- FRAP - *Fluorescence Recovery After Photobleaching* / recuperação da fluorescência após fotobranqueamento;
- Fwd* - *Forward primer* / oligonucleótido iniciador directo;
- G - Guanina;
- GFP - *Green fluorescent protein* / proteína fluorescente verde;
- GTA - triplete formado por guanina, timina e adenina;
- HeLa - Henrietta Lacks;
- HEPES - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* / ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-1-etano-sulfónico;
- HRP - *Horseradish Peroxidase* / peroxidase de rábano;
- hTopo - *human Topoisomerase* / topoisomerase humana;
- HU - Hidroxiureia;
- i.e. - *id est*;
- IF* - *immobile fraction* / fracção imóvel;
- IgG - Imunoglobulina classe G;
- ITR - *Inverted Terminal Repeats* / repetição terminal invertida;
- kDNA - *kinetoplast DNA* / ADN de cinetoplasto;
- LASER - *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*;
- LMP - *Low Melting Point* / baixo ponto de fusão;
- LSM - *Laser Scanning Microscope* / microscópico confocal laser;
- MCM - *MiniChromosome Maintenance Complex* / complexo de manutenção dos cromossomas;
- MG-132 - *Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal*;
- Mlh* - *MutL homolog*;
- MLTU - *Major Late Transcription Unit* / unidade transcricional tardia principal;
- NF - *Nuclear Factor* / factor nuclear;

- NES* - *Nuclear Export Signal* / sinal de exportação nuclear
- NLS* - *Nuclear Localizing Sequence* / sequência de localização nuclear;
- pol* - *polimerase*;
- Oct-1* - *octamer-binding transcription factor 1*;
- ORC* - *Origin Recognition Complex* / complexo de reconhecimento de origem;
- p.i.* - *post-infection* / após a infecção;
- PARP1* - *poly (ADP-ribose) polymerase family*;
- PBS* - *Phosphate Buffered Saline*;
- PCNA* - *Proliferating Cell Nuclear Antigen* / antígeno nuclear de proliferação celular;
- PCR* - *Polymerase Chain Reaction* / reacção de polimerização em cadeia;
- PFEG* - *Pulsed Field Gel Electrophoresis* / electroforese em gel de campo pulsado;
- PMSF* - *Phenyl-Methane-Sulphonyl-Fluoride* / fenil-metano(sulfonil)fluoreto;
- Pre-RC* - *Pre-Replicative Complex* / complexo pré-replicativo;
- Rad27/MF1* - endonucleases reparadoras de ADN;
- Rev* - *Reverse primer* / oligonucleótido iniciador reverso;
- RFC* - *Replication Factor C* / Factor de replicação C;
- RNAi* - *RNA Interference* / ARN de interferência;
- RPA* - *Replication Protein A* / proteína de replicação A;
- S. cerevisiae* - *Saccharomyces cerevisiae*;
- SC35* - *Splicing Component-35*;
- siRNA* - *small interfering RNA* / pequeno ARN de interferência;
- SR proteins* - *Serine/Arginine-rich proteins* / Proteínas ricas em serinas e argininas;
- SUMO* - *Small Ubiquitin-like MOdifier*;
- SV40* - *Simian virus 40* / Vírus símio 40;
- T* - Timina;
- Topo* - Topoisomerase;
- TP* - *Terminal Protein* / Proteína terminal;
- Tris* - Tris(hidroximetil)aminometano;
- UV* - Ultravioleta;
- VIH* - Vírus da imunodeficiência humana / *human immunodeficiency virus (HIV)*;
- wt* - *wild type* / estirpe selvagem;

- kDa - Quilodalton (múltiplo de dalton, Da, unidade para a massa molecular relativa);
- kpb - quilo pares de bases;
- mg/ml - Miligrama por mililitro (submúltiplo do quilograma por submúltiplo de litro, Kg/l);
- mmol - Milimole (Submúltiplo de mole, mol);
- ms - Milisegundo (submúltiplo de segundo, s);
- pH - Simétrico do logaritmo decimal da actividade hidrogeniónica;
- rpm - Rotações por minuto, unidade de frequência usada para medir a velocidade rotacional;
- V/cm - Volts por centímetro (intensidade do campo eléctrico);
- µg - Micrograma (submúltiplo do quilograma, kg);
- µg/ml - Micrograma por mililitro (submúltiplo do quilograma por submúltiplo de litro, Kg/l);
- µl - Microlitro (submúltiplo de litro, l);
- µm - Micrómetro (submúltiplo de metro, m);
- µmol - Micromole (submúltiplo de mole, mol);
- µm²/s - Micrómetro quadrado por segundo (submúltiplos do metro quadrado e da hora);
- °C - Grau Celsius ou centrífugado (unidade SI da grandeza temperatura).

CAPÍTULO I

Introdução

I. INTRODUÇÃO

Quando Watson e Crick (1953) postularam que o ácido desoxirribonucleico (ADN) presente no interior da célula assumia uma conformação tridimensional bi-helicoidal, não se questionaram sobre os inúmeros problemas topológicos que daí podiam advir. Esse crédito deve ser atribuído a James Wang (1971) que descobriu em *Escherichia coli*, uma proteína com capacidade de cortar e de religar o ADN, à qual atribuiu o nome de topoisomerase. A replicação do genoma bacteriano foi o principal fenómeno biológico em que se pensou que esta enzima estivesse envolvida, pois a separação das duas cadeias de ADN, numa região específica, deveria aumentar o super-enrolamento de regiões contíguas do genoma. Em 1975, Wang e Depew mostraram que esta enzima apenas relaxava moléculas de ADN super-enroladas negativamente (para a direita) e que, por isso, não deveria desempenhar um papel relevante na replicação. Alguns meses mais tarde, Gellert *et al.* (1976), descobriram uma segunda topoisomerase em *E. coli* que aliviava os super-enrolamentos positivos, a que chamou topoisomerase II ou ADN girase. Do ponto de vista funcional, estas duas enzimas deviam regular, conjuntamente, a topologia do ADN procariota e levaram Liu e Wang (1987) a apresentar um modelo onde o grau de super-enrolamento do genoma bacteriano dependia da velocidade do processo celular que o originava (replicação, transcrição, reparação, etc), da velocidade de catálise das duas topoisomerases e da capacidade de neutralização dos domínios vizinhos com super-enrolamento no sentido oposto.

Nas células eucariotas, a morfologia do ADN é regulada por topoisomerases mais polivalentes do que as identificadas na *E. coli*. A topoisomerase I relaxa super-enrolamentos negativos e positivos com igual eficiência (Champoux, 1988 e Fröhlich *et al.*, 2007), à semelhança das topoisomerases de tipo II (McClendon *et al.*, 2005). O stresse torsional originado pelo super-enrolamento positivo da hélice à frente da forquilha de replicação, e pelo super-enrolamento negativo atrás desta, é apenas um dos problemas que a célula tem de ultrapassar com o auxílio das topoisomerases. A formação de nós, laços e catenanos que ocorre durante a “abertura” da cromatina antes da replicação e, depois, na sua condensação, são outros exemplos de complexidades topológicas que deverão ser resolvidas antes da segregação cromossómica de forma a evitar quebras no ADN genómico, defeitos cromossómicos e morte celular (Wang, 1996 & McPherson & Goldenberg, 1998). Pelas razões apontadas anteriormente, as

topoisomerases participam no controlo da expressão génica por regularem a morfologia do ADN (Wang, 1996 e referências aí contidas). Saliente-se o facto destas enzimas serem de uma fidelidade extraordinária, por cortarem e religarem uma ou duas cadeias da mesma molécula de ADN sem introdução de erros na sequência genómica.

Na primeira parte deste capítulo será sumariado o estado da arte das topoisomerases I, II α e II β (pontos I.1.1, I.1.2.1 e I.1.2.2., respectivamente). Na segunda parte será feita uma revisão sobre a replicação do ADN em células de mamífero (ponto I.2), e, posteriormente, será revista a replicação do adenovírus (ponto I.3) usada como modelo, com o objectivo de estudar a distribuição nuclear, a dinâmica e a função das topoisomerases na replicação (ver objectivos – ponto I.4).

I.1. Topoisomerases celulares

As topoisomerases são proteínas expressas por todas as células e podem associar-se ao ADN genómico, mitocondrial e cloroplástico. Uma característica comum é o seu mecanismo de acção: após efectuarem um corte temporário na molécula-alvo de ADN, promovem a passagem da cadeia complementar ou de uma molécula vizinha pelo espaço criado. O corte é mantido pela ligação da tirosina do centro catalítico da topoisomerase à extremidade da cadeia clivada, através de uma ligação fosfodiéster. Após diminuir o *stress* torsional ou resolver a complexidade topológica que desencadeou o seu recrutamento, a topoisomerase que formava o complexo de clivagem com o ADN clivado, religa as extremidades livres, libertando-se. De acordo com o tipo de corte que executam na molécula de ADN, as topoisomerases celulares dividem-se em duas famílias: topoisomerases de tipo I (EC 5.99.1.2) que efectuam o corte de uma única cadeia e as topoisomerases de tipo II (EC 5.99.1.3) que clivam as duas cadeias do ADN-alvo. Esta diferença catalítica resulta em diferentes competências no interior da célula; enquanto as topoisomerases de tipo I relaxam super-enrolamentos positivos e negativos, as topoisomerases de tipo II resolvem, adicionalmente, catenanos e laços. Desta forma, as topoisomerases de tipo II podem substituir as topoisomerase de tipo I, não se verificando o inverso.

A presença ubiquitária das topoisomerases sugere que estas enzimas tenham aparecido nos primórdios da vida, em resposta aos problemas criados pela “escolha” do ADN como veículo da informação genética (Duguet, 1997). Se, por um lado, o alinhamento das sequências aponta para que as topoisomerases eucariotas tenham resultado da fusão de genes bacterianos, por outro, algumas parecem ter surgido por duplicação génica, como as isoformas α e β da família II que são expressas nas células dos mamíferos e das aves. A Tabela I sumariza as principais características de cada família e identifica os membros mais estudados.

Tabela I – Classificação das topoisomerases celulares com base nas suas propriedades funcionais e estruturais (Champoux, 2001 e Corbett & Berger, 2004).

Família	Grupo	Tipo de corte	Relaxamento	Características específicas	Exemplos
I	IA	Simple	-	Monomérica Necessita de Mg^{2+}	<i>E. coli</i> : Topo I e III <i>S. cerevisiae</i> : Topo I e III <i>H. sapiens</i> : Topo III (α, β)
	IB	Simple	+ e -	Monomérica Similares às tirosina recombinases	<i>E. coli</i> : Topo IV <i>Poxviridae</i> : Topo I Topo I nos eucariotas
II	IIA	Duplo	+ e -	Necessita de Mg^{2+} e de ATP Homodiméricas nos eucariotas.	<i>E. coli</i> : Topo II e Topo IV <i>A. thaliana</i> : Topo II Topo II nos eucariotas
	IIB	Duplo	+ e -	Presente em todos os organismos.	<i>A. thaliana</i> : Topo VI

Até à data foram descritas cinco topoisomerases nas células humanas: as topoisomerases III α e III β (grupo IA), a topoisomerase I (nuclear e mitocondrial – grupo IB) e as topoisomerases II α e II β (grupo IIA). As topoisomerases I e II α são as mais estudadas em virtude da sua actividade catalítica poder ser inibida por drogas específicas, o que as torna numa ferramenta privilegiada na luta contra o cancro.

I.1.1. Topoisomerase I

Nas células de mamífero, a topoisomerase I mostra duas actividades fisiológicas independentes: o alívio do stresse torsional originado pelos fenómenos de replicação, de transcrição (revisto por Champoux, 2001 e Leppard & Champoux, 2005) e uma actividade cinásica que promove a fosforilação dos factores de *splicing* da família SR (Rossi *et al.*, 1996 e Labourier *et al.*, 1998). A topoisomerase I humana é uma fosfoproteína nuclear, formada por 765 aminoácidos e com uma massa molecular de 91 kDa (D'Arpa *et al.*, 1988). Com uma homologia de sequência que varia entre os 40% e os 50% quando comparada com as outras topoisomerasas de tipo IB, a topoisomerase I apresenta quatro domínios funcionais: o N-terminal (resíduos 1-214), o central (resíduos 215-635), o domínio *linker* (resíduos 636-712) e o C-terminal (resíduos 713-765) (Stewart *et al.*, 1996 e Leppard & Champoux, 2005). O domínio N-terminal, para além das quatro sequências de localização nuclear e uma sequência de localização nucleolar, mostra várias regiões que permitem a interacção da topoisomerase I com outras proteínas nucleares e nucleolares. No entanto, este domínio e o domínio *linker* parecem ser dispensáveis à actividade de relaxamento do ADN *in vitro*, embora aumentem a eficiência *in vivo* (Stewart *et al.*, 1999 e Lisby *et al.*, 2001). É no domínio central que encontramos todos os aminoácidos essenciais à actividade de relaxamento da topoisomerase I, excepto a tirosina do centro catalítico, localizada no domínio C-terminal. O modelo mecanístico da topoisomerase I que assiste à redução do stresse torsional propõe que esta enzima, após efectuar o corte simples de uma das cadeias da dupla hélice e de se ligar ao grupo fosfato da extremidade 3' clivada através do resíduo Tyr⁷²³, promova a rotação do ADN abaixo do corte, relaxando-o (Fig. 1). A religação do ADN requer uma segunda reacção de transesterificação que anula a ligação covalente da enzima à extremidade cortada.

A actividade catalítica da topoisomerase I é inibida especificamente pela camptotecina (Hsiang *et al.*, 1985; Pizzolato & Saltz, 2003 e Leppard & Champoux, 2005) e por drogas análogas a esta: o topotecano (Hycantina®, GlaxoSmithKline) (Beldner *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2007 e O'Brien *et al.*, 2007) e o irinotecano (Camptosar®, Pfizer) (Friedman *et al.*, 2003; Ducreux *et al.*, 2006; Fennell *et al.*, 2007 e Han *et al.*, 2007). A camptotecina (CPT) é um alcalóide de origem vegetal (*Camptotheca acuminata*) que apresenta uma poderosa actividade anti-tumoral por

inibir a síntese de ácidos nucleicos e por induzir fracturas na molécula de ADN. Estes efeitos citotóxicos são desencadeados pela estabilização do complexo de clivagem (ADN-topoisomerase I) e pela inibição da etapa de religação. No curto prazo, a acumulação de complexos ternários ADN-topoisomerase I-droga conduz à redução significativa da transcrição e da replicação por provocar a dissociação das maquinarias de transcrição e de replicação, após a sua colisão com os complexos de clivagem estabilizados. Estas colisões resultam na formação de extremidades livres de ADN que elevam os níveis de p53, induzem a paragem do ciclo celular em G2 e conduzem à apoptose (D'Arpa *et al.*, 1990; Tsao *et al.*, 1993; Osheroff *et al.*, 1994; Mao *et al.*, 2002; Staker *et al.*, 2002 e Capranico *et al.*, 2007).

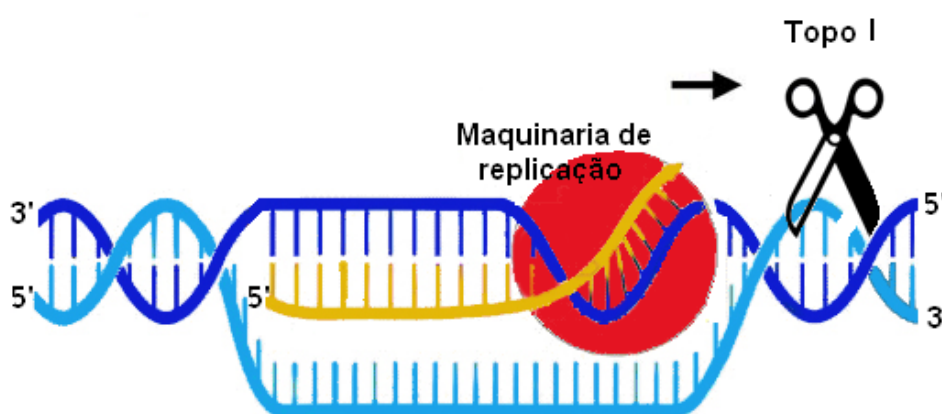


Figura 1 – Papel funcional da topoisomerase I durante a replicação celular. Na imagem apenas uma cadeia de ADN está a ser replicada e a topoisomerase I é representada por uma tesoura. O stress torsional que se forma à frente da forquilha de replicação é aliviado por esta enzima através de um corte transiente numa das cadeias, formando-se um complexo de clivagem (ADN-topoisomerase I). A exposição celular a uma droga anti-topoisomerase I diminui a processividade da ADN polimerase numa primeira fase, e numa segunda fase, a sua colisão com o complexo de clivagem estabilizado (ADN-topoisomerase I-Droga) conduz à formação de extremidades livres na molécula de ADN.

A topoisomerase I é expressa constitutivamente ao longo de todo o ciclo celular (Baker *et al.*, 1995 e Meyer *et al.*, 1997) e mostra um padrão de distribuição difuso no nucleoplasma, com acumulação no nucléolo (Christensen *et al.*, 2002a e Rallabhandi *et al.*, 2002). Esta acumulação nucleolar não constitui surpresa devido à intensa actividade transcricional que ocorre no interior do nucléolo e ao forte super-enrolamento que o ADN ribossomal deverá apresentar (Mondal *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2004 e

Capranico *et al.*, 2007). Estudos imunocitoquímicos permitiram observar a co-localização da topoisomerase I com os centros fibrilares, a ARN pol I (Mondal *et al.*, 2003 e Christensen *et al.*, 2004), a nucleolina (Bharti *et al.*, 1996 e Edwards *et al.*, 2000), a PARP1 (Bauer *et al.*, 2001) e a proteína Werner (Lebel *et al.*, 1999 e Laine *et al.*, 2003). Estas prováveis interações proteína-proteína reforçam a ideia da topoisomerase I participar na transcrição e justificam a mobilidade reduzida da população nucleolar (Christensen *et al.*, 2002a).

Embora a topoisomerase I seja indispensável durante o desenvolvimento embrionário de *Drosophila spp.* e de ratinho (Morham *et al.*, 1996 e Cobb *et al.*, 1997), o mutante condicional em levedura mostra viabilidade (Sadoff *et al.*, 1995 e Castano *et al.*, 1996), bem como as células de mamífero *knock out* para esta proteína, possivelmente porque a topoisomerase II pode complementar em grande parte a sua função na regulação de topologia do ADN.

I.1.2. Topoisomerases tipo II

Os eucariotas superiores apresentam duas isoformas para a topoisomerase II: a isoforma α e a isoforma β (Drake *et al.*, 1987; Chung *et al.*, 1989 e Grue *et al.*, 1998). No Homem, apesar das duas isoformas serem codificadas em *loci* diferentes (cromossomas 17 e 3, respectivamente), a homologia apreciável das suas sequências ($\approx 75\%$), resulta em conformações tridimensionais semelhantes e em massas moleculares próximas (170 kDa *versus* 180 kDa). Estruturalmente, as duas isoformas partilham o domínio N-terminal que mostra actividade ATPásica e o domínio central que contém a tirosina catalítica (Tyr⁸⁰⁴ na isoforma α e Tyr⁸²¹ na isoforma β). O terceiro e último domínio, o C-terminal, é o que confere a especificidade funcional às duas isoformas (Krieser *et al.*, 2001 e Linka *et al.*, 2007). Este domínio apresenta inúmeras sequências de reconhecimento para interações do tipo proteína-proteína e vários resíduos que podem ser modificados após a tradução regulando, desta forma, a actividade das topoisomerases II. No interior da célula, as topoisomerases de tipo II actuam como dímeros, necessitam de 2 moléculas de ATP por cada ciclo catalítico e de catiões bivalentes que optimizam a catálise (Mg^{2+} e Ca^{2+}) (Almouzni & Méchali, 1988; Champoux, 2001 e Strick *et al.*, 2001). Enquanto o consumo da primeira molécula de

ATP ocorre depois do corte transiente da primeira hélice de ADN, a segunda molécula de ATP é hidrolisada após a passagem da segunda hélice pelo sítio de corte, antes da recuperação da conformação inicial do dímero e a libertação das duas moléculas de ADN.

O facto da actividade fisiológica da topoisomerase II α ser indispensável à célula e desta ser inibida por uma panóplia de drogas, tornou-a num alvo privilegiado na terapêutica do cancro. Algumas dessas drogas funcionam como inibidores irreversíveis (ou “venenos”), como por exemplo o etoposido e a doxorubicina, enquanto outras são inibidores reversíveis, como as bisdioxopiperazinas (ICRF-193, ICRF-187/dexrazoxano) (Jensen *et al.*, 2000; Classen *et al.*, 2003 e Germe & Hyrien, 2005). Os inibidores irreversíveis estabilizam complexos de clivagem topoisomerase-DNA e induzem quebras no DNA por colisão das maquinarias de replicação e de transcrição com os complexos de clivagem estabilizados (Montecucco *et al.*, 2001 e Wilstermann *et al.*, 2007). Os efeitos citotóxicos que decorrem dessas fracturas da cadeia de ADN levou a que estas drogas fossem denominadas de “venenos”, em contraste com os inibidores reversíveis que não lesam a molécula de ADN. Para além da acção anti-tumoral, os inibidores reversíveis têm sido usados na protecção do tecido muscular cardíaco por diminuírem a formação de radicais livres pelas antraciclina usadas nos *cocktails* antineoplásicos (Speyer *et al.*, 1990; Hasinoff *et al.*, 2002 e Hasinoff *et al.*, 2003).

I.1.2.1. Topoisomerase II α

O dímero formado pela isoforma α é indispensável à proliferação celular, pois é a única que promove a separação das cromátides-filhas durante a mitose, função em que não pode ser substituída pela isoforma β . Nas células humanas, esta isoforma α mostra concentrações crescentes entre o final da fase G1 e a anafase, verificando-se a sua queda acentuada no início de G1 (Heck *et al.*, 1988; Kimura *et al.*, 1994 e Agostinho *et al.*, 2004). São vários os factores que concorrem para a regulação dos níveis da topoisomerase II α ao longo do ciclo celular: a activação e a repressão transcricional do gene, a estabilização do ARNm (Goswami *et al.*, 2000), e a alteração do tempo de semi-vida da proteína (Heck *et al.*, 1988) nomeadamente pela sua degradação pela via da ubiquitina-proteossoma (Mao *et al.*, 2001). Adicionalmente, a topoisomerase II α mostra

variações notáveis na sua actividade catalítica ao longo do ciclo celular, fruto de modificações pós-traducionais como a SUMOilação (Azuma *et al.*, 2005 e Agostinho *et al.*, 2008) e a fosforilação (Ishida *et al.*, 2001 e Chikamori *et al.*, 2003). A nível tecidual, os tecidos com índice mitótico elevado (timo, medula óssea, testículo, tumores, etc) exibem concentrações mais elevadas de topoisomerase II α (Heck *et al.*, 1988 e Woessner *et al.*, 1990) que os tecidos diferenciados pós-mitóticos (Heck & Earnshaw 1986; Austin & Marsh, 1998 e Uggla *et al.*, 2001).

Nas células de mamífero e durante a fase S, o padrão de distribuição da topoisomerase II α mostra uma forte acumulação no nucleólo e acumulações discretas no nucleoplasma (Meyer *et al.*, 1997 e Mirski *et al.*, 1999). Enquanto a acumulação nos nucleólos é justificada pela transcrição nucleolar pela ARN Polimerase I, a acumulação nos focos nucleoplasmáticos é legitimada pela sua participação na replicação (Niimi *et al.*, 2001; Cuvier & Hirano, 2003 e Agostinho *et al.*, 2004). Durante G2, a topoisomerase II α mostra forte localização centromérica, e na transição G2/M até final da anafase acumula-se nos eixos cromossómicos para resolver os catenanos formados durante a replicação (Earnshaw & Heck, 1985; Gasser *et al.*, 1986 e Mo & Beck 1999). A resolução dos catenanos é de importância capital para a célula e deve ocorrer antes da migração das cromátides para os pólos. A sua manutenção implica uma segregação cromossómica deficiente, com situações de aneuploidia, poliploidia e morte celular (Larsen *et al.*, 2003 e Hau *et al.*, 2006).

I.1.2.2. Topoisomerase II β

A topoisomerase II β foi identificada pela primeira vez em células humanas por Drake *et al.* (1987). Apesar de ter uma estrutura tridimensional semelhante à da isoforma α , o dímero da isoforma β apresenta menor sensibilidade à generalidade dos fármacos anti-topoisomerase II *in vitro* e *in vivo* (Austin & Marsh 1998; Zhou *et al.*, 2001 e Asano *et al.*, 2005). A distribuição tecidual da topoisomerase II β é universal e inclui todos os tecidos pós-mitóticos como, por exemplo, o muscular e o nervoso (Turley *et al.*, 1997 e Austin & Marsh, 1998).

Durante a interfase, a isoforma β mostra uma distribuição punctiforme no nucleoplasma e uma forte acumulação nucleolar junto das regiões fibrilares (Negri *et*

al., 1992; Meyer *et al.*, 1997 e Christensen *et al.*, 2002b). Na mitose localiza-se nos braços cromossômicos e no citoplasma (Taagepera *et al.*, 1993 e Christensen *et al.*, 2002b) sem, no entanto, mostrar acumulação centromérica. Embora ambas as topoisomerasas II α e II β se distribuam ao longo dos cromossomas mitóticos, a sua co-localização não é perfeita e a hipótese da redundância de actividades tem sido afastada. Trabalhos recentes mostraram que a topoisomerase II β não é essencial à mitose, podendo ser substituída pela isoforma α sem que a condensação e/ou a segregação dos cromossomas mitóticos apresente alterações (Sakaguchi & Kikuchi 2004). Apesar destas evidências sugerirem que a topoisomerase II β tenha uma função menor, o seu surgimento relativamente recente ao longo da evolução, o facto de formar heterodímeros com a isoforma α *in vivo* e de ser expressa em todos os tecidos antecipam uma elevada complexidade funcional. Com efeito, o estudo recente do desenvolvimento embrionário em ratinhos *knockout* para a topoisomerase II β , mostrou que a ausência desta proteína não conduzia a malformações fetais. No entanto, todos os ratinhos morriam às primeiras horas de vida, com problemas respiratórios causados pela deficiente inervação do diafragma e com alterações neurológicas por encerramento incompleto do tubo neural e desorganização dos estratos celulares do cerebelo (Yang *et al.*, 2000; Tsutsui *et al.*, 2001 e Tsutsui *et al.*, 2006). Segundo Lyu *et al.* (2006), os sinais clínicos observados nos ratinhos *knockout* deverão encontrar resposta na localização da topoisomerase II β junto à região promotora dos genes que regulam o desenvolvimento embrionário do sistema nervoso. No animal saudável, o nível de transcrição destes genes parece ter relação directa com o número de clivagens que a topoisomerase II β realiza nas suas regiões promotoras.

I.2. Replicação do ADN em células de mamífero

Uma das propriedades mais importantes nos seres vivos é a sua capacidade de reprodução, podendo dessa forma transmitir as suas características, perpetuando a espécie e contribuindo para a evolução biológica. Desta forma, todas as células filhas transportam o material genético herdado das células mães, assegurando a identidade morfológica e funcional de uma célula, de um tecido, de um órgão e de uma espécie.

O património genético de uma célula é codificado sob a forma de moléculas de ADN e é separado do citoplasma por um invólucro nuclear que o protege de agressões químicas e físicas. Estima-se que numa célula humana diplóide existam, aproximadamente, 6 milhões de pares de bases de ADN, o que corresponde a um comprimento de cerca de 2 metros caso o genoma fosse linearizado. Como o núcleo é um organelo que apresenta, em média, 10 μm de diâmetro, o ADN só pode permanecer no seu interior, caso sofra múltiplos níveis de compactação.

Desde as observações citológicas feitas em células de mamífero por Heitz (1928), que é possível distinguir regiões intra-nucleares de maior densidade, correspondentes a zonas de heterocromatina, e regiões menos densas, identificadas como regiões de eucromatina. As primeiras apresentam-se, geralmente, à periferia do núcleo e em redor do nucléolo e correspondem a sequências não codificantes, ao contrário da eucromatina que se dispersa pelo nucleoplasma e é rica em genes que podem estar ou não activos, dependendo do tipo celular e dos estímulos ambientais. Do ponto de vista funcional, a heterocromatina desempenha algumas funções biológicas importantes, nomeadamente a protecção da eucromatina de agressões (quebras e rearranjos), a regulação da expressão génica e a estabilização de regiões cromossómicas funcionamente relevantes como os telómeros e os centrómeros.

Devido à extensão do genoma eucariota, a replicação inicia-se simultaneamente em múltiplas regiões nucleares, de forma a assegurar que a totalidade do genoma seja replicado num intervalo de tempo correspondente à fase S, cerca de 6-8 horas (Fox *et al.*, 1991; O’Keefe *et al.*, 1992; Hozak *et al.*, 1994 e Hughes *et al.*, 1995). A forma organizada como ocorre deve-se a um complexo programa de regulação temporoespacial, ainda insuficientemente compreendido. A agregação espacial das várias origens de replicação que são activadas simultaneamente (fábricas de replicação), dá origem a cinco padrões de replicação que se sucedem ao longo da fase S (Fig. 2) (Blow & Laskey, 1986; Ferreira & Carmo-Fonseca, 1997 e Ferreira *et al.*, 1997).

Estudos imunocitoquímicos em células sincronizadas permitiram concluir que no início e durante as primeiras 2 a 3 horas da fase S, os focos de replicação são muito numerosos, de dimensões reduzidas e distribuem-se por todo o nucleoplasma, nas regiões eucromáticas (padrões I e II). À medida que a fase S progride, a replicação no centro do nucleoplasma abrande e novos focos activos concentram-se na periferia do núcleo e dos nucléolos (padrão III, fase S intermédia). Na segunda metade da fase S ocorre a replicação da heterocromatina, formando-se grandes focos de replicação peri-

nuclear e peri-nucleolar (padrão IV). Por fim, na fase S muito tardia são observados no centro do nucleoplasma focos de grandes dimensões que correspondem à replicação de grandes blocos de heterocromatina (padrão V) (Fig. 2). Segundo Hassan *et al.* (1994), o argumento da organização tridimensional do genoma interfásico é reforçado pelo facto dos locais de replicação estarem na vizinhança dos locais de transcrição activa, particularmente, no início da fase S.

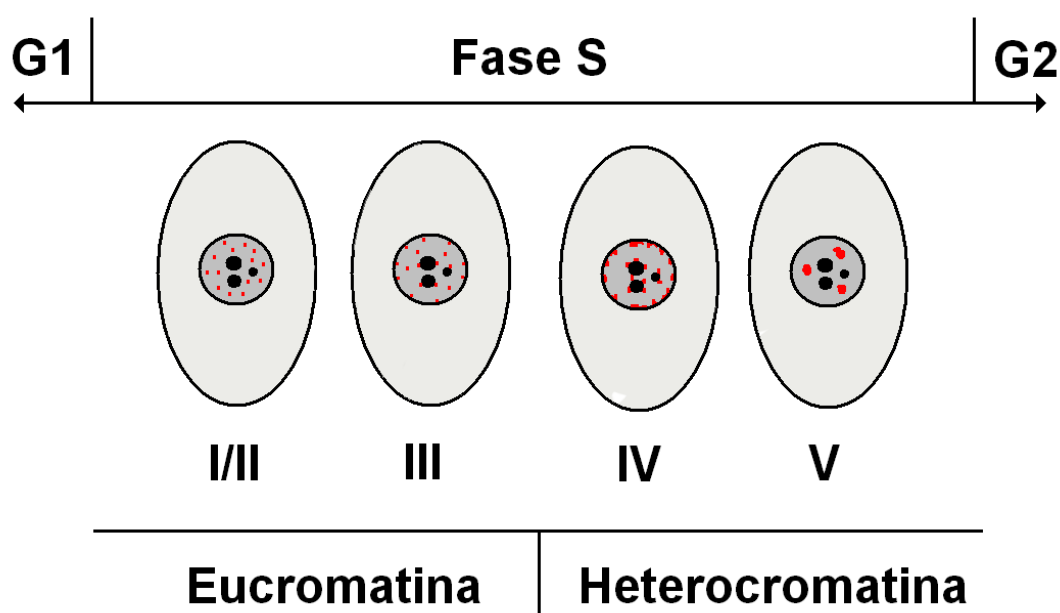


Figura 2 – Programa de replicação da cromatina em células de mamífero. Na primeira metade da fase S, a eucromatina é replicada em pequenos e numerosos focos dispersos pelo nucleoplasma (padrões I/II e III). Nos estádios finais da fase S, a replicação da heterocromatina é feita em focos de maiores dimensões (padrões IV e V).

Na *E. coli*, o tempo necessário para a replicação total do seu genoma circular é de cerca de 42 minutos, o que implica uma velocidade de elongação de 1000 pares de bases (pb) por segundo, uma vez que o genoma contém $4,4 \times 10^6$ pb. No caso das células humanas, a velocidade de replicação é de 100 pb por segundo, demorando perto de 8 horas para completar com êxito a replicação dos 3×10^9 pb.

A nível molecular, o modelo que explica a transmissão da informação genética entre gerações foi proposto por Watson e Crick (1953). A molécula de ADN que apresenta uma conformação espacial de dupla hélice antiparalela, mostra na sua parte mais interna duas cadeias de bases azotadas complementares e ligadas entre si por

pontes de hidrogénio e, na parte externa, um esqueleto de grupos fosfato e açúcares. Como o emparelhamento entre as bases azotadas se faz entre uma base purínica e uma base pirimidínica, a adenosina (A) emparelha com a timina (T) e a citosina (C) com a guanina (G). Desta forma, a sequência de uma cadeia pode ser deduzida a partir da sua cadeia complementar. Alguns anos mais tarde, Meselson e Stahl (1958) provaram *in vivo* que o modelo de replicação semi-conservativa postulado por Watson e Crick era consistente, ao mostrarem que cada cadeia-mãe servia de molde para a síntese de uma cadeia-filha que lhe era complementar. Durante este fenómeno intervêm, sequencialmente, um grande número de proteínas que reconhecem as origens de replicação e que, por sua vez, recrutam a maquinaria de replicação.

As sequências necessárias para definir uma origem de replicação variam significativamente entre espécies. No eucariota unicelular *Saccharomyces cerevisiae*, 3 ou 4 sequências de 10-15 pb são suficientes para actuarem como origem de replicação. Estas sequências incluem uma região muito conservada conhecida por *autonomously replicating sequence (ARS)* que, por ser rica em bases A e T, facilita o desenrolar da hélice de ADN. Na levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe*, as origens de replicação estendem-se entre os 800 e os 1000 pb. A análise detalhada destas sequências permitiu a identificação de regiões com 20 a 50 pb, ricas em bases A e T. Nos metazoários, as origens encontram-se ainda menos definidas e estendem-se ao longo de centenas de pares de bases. Por último, em *Drosophila melanogaster* e *Xenopus laevis* não parecem existir sequências específicas, o que poderá facilitar uma fase S muito rápida em certas fases do desenvolvimento embrionário.

I.2.1. Complexo de pré-replicação - componentes e regulação

Apesar da replicação ser um fenómeno exclusivo da fase S, a organização temporo-espacial das futuras origens de replicação é efectuada durante a fase G1. A selecção das sequências é realizada numa primeira fase por um complexo multiproteico designado complexo de reconhecimento da origem (*Origin Recognition Complex* - ORC). Após ligação à cromatina, o complexo multiproteico ORC é responsável pelo recrutamento sequencial das proteínas *Cdc6* (*cell division cycle 6*), *Cdt1* (*chromatin licensing and DNA replication factor 1*) e do complexo MCM (*MiniChromosome Maintenance*

Complex) que, em conjunto, formam o complexo de pré-replicação (*Pre-Replication Complex* – pre-RC). A formação do complexo de pré-replicação é o primeiro evento e o acontecimento-chave de toda a replicação celular. Uma vez organizado, o complexo de pré-replicação espera a activação de duas cinases que regulam a transição G1/S antes do recrutamento das ADN polimerases para o substrato.

O complexo ORC é formado por cinco subunidades (*Orc1-Orc5*) e apresenta grande afinidade para regiões ricas em nucleótidos A e T. Em *S. cerevisiae* foi identificado um motivo AT na sub-unidade *Orc4* que reconhece as sequências *ARS*. A ligação da subunidade *Orc1* à origem de replicação implica o recrutamento e a hidrólise de uma molécula de ATP (Bell & Stillman, 1992 e Austin *et al.*, 1999). Klemm e Bell (2001) mostraram que a ligação do ATP à subunidade *Orc1* promove o recrutamento e a ligação da proteína *Cdc6* ao complexo ORC. Natale *et al.* (2000) mostraram em células humanas, que a subunidade *Orc1* sofre proteólise no final da fase S e que as restantes sub-unidades são removidas durante a condensação da cromatina na mitose, só voltando a associarem-se à cromatina no início da fase G1, evitando a replicação do genoma fora de tempo.

A proteína *Cdc6* é uma ATPase indispensável à replicação por facilitar o recrutamento e a organização do complexo MCM junto às origens de replicação. Em células de mamífero, a actividade da proteína *Cdc6* é dependente do seu estado de fosforilação que é regulado pela cinase ciclina-dependente (*Cyclin-Dependent Kinase* - *Cdk*). A fosforilação do seu domínio N-terminal expõe a sequência de exportação nuclear (*Nuclear Export Signal* – *NES*), conduzindo-a ao citoplasma durante as fases G2 e M. Durante a mitose, a proteína *Cdc6* é degradada pelo sistema ubiquitina-proteossoma.

A proteína *Cdt1* foi inicialmente identificada na *S. pombe* e tem sido apontada como uma proteína-chave na montagem do complexo de pré-replicação. Nishitani *et al.* (2000) mostraram que mutações nesta proteína resultavam num bloqueio da replicação e na activação do *checkpoint* intra-fase S. Actualmente, pensa-se que o papel fisiológico desta proteína seja o de colaborar, cooperativamente, com a *Cdc6* de forma a promover a ligação das proteínas *Mcm2-7* à cromatina.

O complexo MCM foi originalmente identificado nos *screens* genéticos para proteínas envolvidas na manutenção de plasmídeos e apresenta seis subunidades nos eucariotas superiores. Estudos morfológicos e bioquímicos sugerem que a ligação do complexo MCM à cromatina, requer a ligação prévia do complexo ORC e da proteína

Cdc6 à origem de replicação. Estudos de microscopia electrónica revelaram que o complexo proteico MCM2-7, assume uma forma de *doughnut in vivo*, com seis lóbulos e uma cavidade central que circunda a hélice de ADN. Enquanto as proteínas *Mcm4-6-7* têm uma actividade de helicase no sentido 3'→5', as *Mcm2-3-5* deslocam-se no sentido 3'→5' a partir das origens de replicação (Sato *et al.*, 2000). Desta forma, à medida que desenrolam e afastam as duas cadeias parentais através da quebra das pontes de hidrogénio entre as bases azotadas, preparam o ADN para ser reconhecido por outras proteínas multiméricas (ADN metiltransferases, a ciclina A, a *Cdk2* e a *Rpa70*). Durante a fase S, os complexos MCM activos co-localizam com a polimerase ϵ e as helicases inactivas são exportadas para o citoplasma após a fosforilação pela *Cdk*, durante as fases S, G2 e M.

A formação do complexo de pré-replicação é também regulada por elementos regulatórios em *trans* que sinalizam a fase do ciclo celular, de forma a garantir a replicação única de cada origem. A acumulação de ciclinas e o aumento da actividade da *Cdk* em S, G2 e M induzem a hiperfosforilação das várias subunidades do complexo ORC, da proteína *Cdt1* e das helicases *Mcm2-7*, o que resulta na sua exportação (Coleman *et al.*, 1996). Por último, a plasticidade morfológica da cromatina também deve regular a actividade e a temporização das origens de replicação. São várias as evidências que suportam esta hipótese: a cromatina replicante no início e no fim da fase S tem diferentes densidades; as alterações na expressão génica durante o desenvolvimento encontram-se relacionadas com modificações estruturais da cromatina e, por fim, vários estudos indicam que a deposição das subunidades Orc e das proteínas *Mcm* é dependente da actividade dos complexos de remodelação cromatínica (Poot *et al.*, 2004 e referências aí contidas).

I.2.2. Anatomia da forquilha de replicação

Uma parte substancial do conhecimento sobre os componentes que participam na formação da forquilha de replicação, foi obtido a partir de estudos *in vitro* realizados num plasmídeo que contém uma origem de replicação do *Simian Virus 40 (SV40)*. Nas células eucariotas foram identificadas cinco ADN polimerases (α , β , γ , δ e ϵ) e, com excepção da polimerase γ , que é responsável pela replicação do ADN mitocondrial,

todas mostram localização intranuclear durante a interfase. Estas enzimas que têm capacidade de sintetizar ADN apenas no sentido 5' → 3', obrigam à existência de dois tipos de replicação, uma contínua que ocorre na cadeia avançada (*leading strand*), e outra descontínua, na cadeia atrasada (*lagging strand*) onde o sentido da replicação é contrário à direcção do crescimento da cadeia-filha. Para que a síntese tenha início, são necessários pequenos oligonucleótidos de ARN com sequências complementares que se ligam à cadeia-mãe por pontes de hidrogénio. Estes fragmentos de ARN são sintetizados por uma primase e são conhecidos como fragmentos iniciadores ou ARN iniciador. Com o avançar da replicação, as duas forquilhas de replicação estendem-se em direcções opostas. Voltamos a salientar que a cadeia atrasada é polimerizada na direcção oposta ao avanço da forquilha de replicação, através da síntese e ligação de múltiplos fragmentos de ADN (fragmentos de *Okasaki*). Para que ocorra a junção de dois fragmentos de *Okasaki* contíguos, é necessária a remoção do ARN iniciador a partir da extremidade 5' por uma ARNase com actividade exonucleásica.

A ADN polimerase α (*pol* α) é a única polimerase celular capaz de iniciar a síntese de ADN *de novo*. Após a *pol* α sintetizar um fragmento de ADN, com 40 nucleótidos de comprimento (Wang, 1996 e referências aí contidas) e deste se ligar ao *primer* de ARN, a polimerase α é substituída pela polimerase γ ou ϵ , uma vez que a primeira não tem actividade processiva e se dissocia do *template* após a síntese do *primer*. A actividade das polimerases celulares é regulada pelo seu estado de fosforilação que aumenta em G2 e M, e por várias proteínas que participam na forquilha de replicação: a proteína de replicação A, o factor de replicação C e o antigénio nuclear de proliferação celular.

A proteína de replicação A (*Replication Protein A* – *RPA*) apresenta uma elevada afinidade de ligação para cadeias nucleotídicas desemparelhadas, ligando-se ao ADN sob a forma de um complexo heterotrimérico. Trabalhos recentes mostraram que esta proteína é essencial aos fenómenos de replicação, de recombinação e na reparação do ADN. No núcleo, a *RPA* parece promover a função das helicases *Mcm2-7* junto à forquilha de replicação, incrementar a actividade da polimerase α e da primase, e recrutar o factor de replicação C (*Replication Factor C* – *RFC*) e o antigénio nuclear de proliferação celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen* – *PCNA*). A actividade da *RPA* depende do seu nível de fosforilação que é controlado pelas cinases dependentes de ciclina, e é máximo, durante a fase S, G2 e na resposta de reparação do ADN. Estudos imunocitoquímicos revelaram que a *RPA* intra-nuclear se acumula em focos discretos

que co-localizam com os focos da proteína *Orc1* e da proteína *Cdc6* durante G1 e com os focos de replicação durante a fase S (Coleman *et al.*, 1996).

O factor de replicação C (*replication factor C* – RFC) é outro complexo-chave envolvido no recrutamento indirecto das polimerases para junto da forquilha de replicação e no recrutamento e posicionamento correcto do complexo homotrimérico do PCNA. Formado por cinco sub-unidades muito conservadas nos eucariotas, o complexo RFC apresenta afinidade específica para a região *primer-template*. A ligação à molécula de ADN é ATP-dependente.

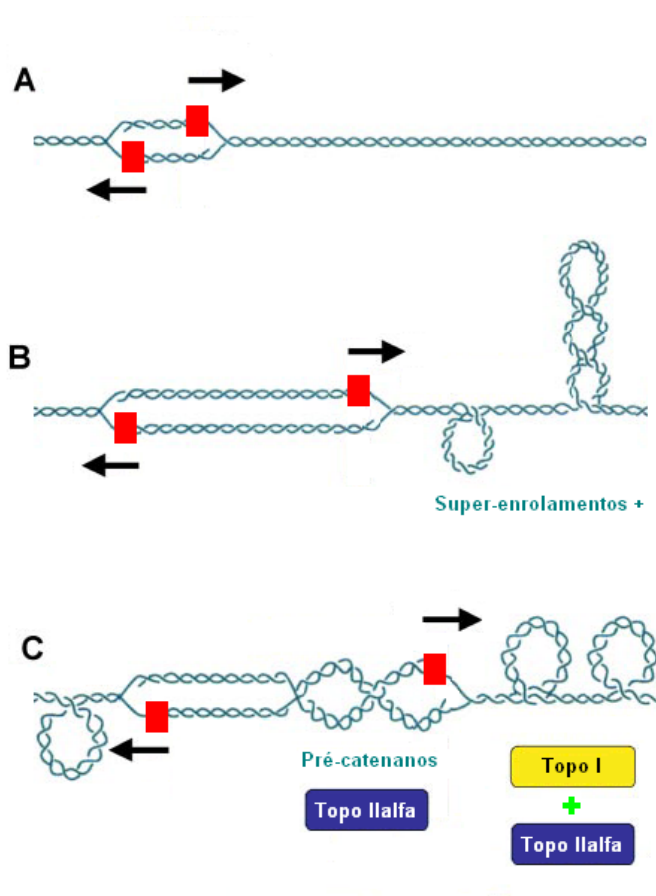
No interior do núcleo, o complexo de PCNA assume a forma de um anel fechado que circunda e desliza sobre a dupla-hélice. O PCNA favorece a processividade das polimerases δ e ϵ e co-localiza com os focos de replicação, mimetizando as várias sub-fases da fase S (Fig. 2). Segundo Stukenberg *et al.* (1994), a libertação do complexo de PCNA após a síntese ter terminado deverá ser da responsabilidade do complexo RFC. Adicionalmente, o PCNA participa no controlo do ciclo celular ao interagir com outras proteínas nucleares, como são exemplo a *Rad27/MF1* nuclease, a ADN ligase, a ADN-metiltransferase, as proteínas reparadoras *Mlh1* e *Mlh2* (*Mutl homolog1 e 2*), etc.

1.2.3. Papel das topoisomerases na forquilha de replicação

Os eventos que ocorrem na forquilha de replicação induzem a formação de problemas topológicos na hélice de ADN que têm de ser resolvidos. A deslocação das maquinarias de replicação nas cadeias molde origina super-enrolamentos positivos à frente da forquilha de replicação (Fig. 3). Como as helicases *Mcm2-7* separam as cadeias parentais mas não as desenrolam, caso o stresse torsional que se acumula não seja aliviado pelas topoisomerases, a dificuldade em separar as duas cadeias replicantes aumenta, constituindo um bloqueio efectivo ao avanço da replicação (Kim & Wang, 1989 e Wang, 2002). Por outro lado, este super-enrolamento positivo provoca super-enrolamentos negativos compensatórios a jusante da maquinaria de replicação que são transferidos para o ADN recém-formado sob a forma de catenanos (Wang, 2002; Schwartzman & Stasiak, 2004 e McClendon *et al.*, 2005).

Atendendo a que a topoisomerase I relaxa super-enrolamentos + e – (Pommier *et al.*, 1998 e Champoux, 2001) e que só as topoisomerases de tipo II são capazes de resolver catenanos, tem sido aceite que a primeira actue à frente da forquilha e que as

segundas, em particular a isoforma α , funcionem exclusivamente atrás da forquilha promovendo a resolução de catenanos (Lucas *et al.*, 2001). Segundo McClendon *et al.* (2005), a topoisomerase II α também deverá trabalhar à frente da forquilha de replicação porque compensa a perda de actividade da topoisomerase I na *E. coli* e nas leveduras replicantes (Kim & Wang, 1989 e Wasserman *et al.*, 1993), relaxa super-enrolamentos positivos mais rapidamente que super-enrolamentos negativos (McClendon *et al.*, 2005) e, por fim, porque só desta forma são explicados os efeitos citotóxicos dos venenos anti-topoisomerase II.



Adaptado de Wang (*Nat Rev Mol Cell Biol* 2002 3:430-440)

Figura 3 – Papel funcional das topoisomerases celulares junto às forquilhas de replicação. As maquinarias de replicação são representadas por dois rectângulos vermelhos que se movem ao longo do ADN replicante e em direcções opostas. **A)** No início da replicação e após as duas cadeias-mãe serem separadas pelas helicases *Mcm2-7*, a polimerase α sintetiza um oligonucleótido curto. **B)** O avançar da maquinaria de replicação induz super-enrolamento positivo a jusante das forquilhas de replicação. **C)** Formação de pré-catenanos atrás da maquinaria de replicação, causados por um super-enrolamento negativo compensatório. O modelo propõe que as topoisomerases I e II α resolvam os super-enrolamentos positivos à frente da forquilha de replicação e que apenas a topoisomerase II α remova os pré-catenanos.

I.3. Adenovírus

Os adenovírus foram identificados pela primeira vez por dois laboratórios independentes. Rowe *et al.* (1953), observaram a morte prematura de culturas celulares obtidas a partir de adenóides humanos, enquanto que Hilleman e Werner (1954) isolaram das secreções respiratórias de soldados norte-americanos, agentes que induziam efeitos citopáticos semelhantes aos observados pela equipa anterior.

Historicamente, o adenovírus encontra-se associado a importantes descobertas científicas. A primeira evidência de oncogenicidade viral foi obtida após a inoculação de adenovírus serótipo 12 em hamsters (Trentin *et al.*, 1962); desde então, o fenómeno da oncogénese tem sido estudado usando os adenovírus como modelo biológico. Em 1977, o estudo da biogénese do ARN mensageiro nos adenovírus levou à descoberta dos intrões e do mecanismo de *splicing* (Chow *et al.*, 1977). Nas duas últimas décadas, o estudo de culturas celulares infectadas com este agente tem contribuído para o adensar do conhecimento sobre os factores que regulam a expressão de genes celulares e virais, os aspectos básicos da replicação do ADN e os mecanismos de controlo do ciclo celular. Por outro lado, a fácil manipulação laboratorial deste vírus, a possibilidade de induzir infecções síncronas, de realizar estudos de análise mutacional e o conhecimento profundo do seu ciclo vital justificam o elevado número de publicações científicas que usam o adenovírus como modelo biológico. A maioria desses estudos utilizaram os serótipos 2 e 5 por não apresentarem potencial oncogénico para os mamíferos e não provocarem aglutinação dos eritrócitos de ratinho (Tabela II).

No campo clínico, o adenovírus infecta um leque muito variado de mamíferos e de aves (estão descritos cerca de 100 serótipos passíveis de causar doença) (Ginsberg & Young, 1976; Suzuki *et al.*, 2008). Em medicina veterinária, as infecções causadas por este agente patogénico assumem elevada importância na clínica dos pequenos animais (hepatite infecciosa canina e traqueobronquite infecciosa/tosse do canil) e na clínica de espécies pecuárias, onde os problemas respiratórios e gastrointestinais em efectivos bovinos (Narita *et al.*, 2003 e Gogev *et al.*, 2003), suínos (Elazhary *et al.*, 1985 e Farre *et al.*, 1999) e avícolas (Bakay *et al.*, 1992 e Le Goff *et al.*, 2003) conduzem a perdas económicas significativas. Na espécie humana, dados epidemiológicos mostram que o adenovírus é responsável por 10% a 15% da morbilidade respiratória nos EUA, queratoconjuntivites de características epidémicas e 15% das gastroenterites a nível mundial.

Recentemente, a infecção pelo adenovírus despertou a atenção da comunidade científica, em virtude do número crescente de casos fatais por co-infecção com o VIH (De Jong *et al.*, 1999; Forrest, 2004; Kostence *et al.*, 2004 e Mazoyer *et al.*, 2008) e das infecções nasocomiais e comunitárias de mau prognóstico em indivíduos transplantados ou com doenças imunomediadas (Slatter *et al.*, 2005; Willems *et al.*, 2007 e Suzuki *et al.*, 2008).

Tabela II – Classificação dos membros que compõem a família *Adenoviridae*. A sublinhado estão indicados o subgrupo, o serótipo e o potencial oncogénico do vírus utilizado nos nossos trabalhos.

Subgrupo	Serótipos	Potencial oncogénico	
		Animais	Culturas
A (fraca ou inexistente)	12,18,31	Alto	+
B (aglutinação total de eritrocitos de macaco)	3,7,11,14,16,21,34,35	Moderado	+
<u>C</u> (aglutinação parcial de eritrócitos de ratinho)	1,2,5,6	<u>Ausente</u>	<u>±</u>
D (aglutinação total de eritrócitos de ratinho)	8-10,13,15,17,19,20,22-30,32,33,36-39,42-49, 51	Baixo	+
E	4	Baixo	+
F	40,41	Desconhecido	+

I.3.1. Organização do genoma adenoviral

O genoma do adenovírus obedece a uma poderosa organização temporo-espacial, onde os genes que codificam para proteínas com funções semelhantes e/ou necessárias na mesma fase de infecção, mostram proximidade. O genoma viral transporta cinco unidades de transcrição precoce (E1A, E1B, E2, E3 e E4), duas unidades de transcrição intermédias (IX e IVa2) e uma unidade de transcrição tardia (*Major Late Transcription Unit - MLTU*). Enquanto a unidade precoce E1A codifica duas proteínas que activam a transcrição viral e forçam a entrada da célula numa pseudo-fase S, as proteínas da unidade E1B bloqueiam a apoptose celular. As unidades E2 e E3 codificam proteínas regulatórias da replicação e da transcrição virais, e a unidade tardia, proteínas estruturais da cápside. Aparentemente, apenas a unidade transcricional E4 codifica para proteínas com funções díspares entre si (regulação da transcrição e da replicação, transporte do ARNm viral e inibição da apoptose celular).

Adicionalmente, o facto de dois genes presentes nesta unidade serem transcritos pela ARN *pol* III tem sustentado a hipótese do adenovírus ancestral ter um genoma simplificado, ao qual novas unidades de transcrição têm vindo a ser acrescentadas de forma a tornar o vírus mais robusto.

Vários argumentos têm sido apontados para justificar a organização do genoma em unidades transcricionais, como a temporização dos eventos (Brown *et al.*, 1975 e Wong & Hsu, 1989), a regulação transcricional pelas unidades anteriores que funcionam como elementos *cis* e as vantagens biológicas óbvias em codificar na mesma unidade, proteínas que interagem física e/ou funcionalmente. Apesar da utilidade funcional que decorre da organização do genoma viral, o surgimento de serótipos viáveis por recombinação genética é pouco frequente, ocorrendo em culturas co-infectadas (Ginsberg & Young, 1976).

I.3.2. Replicação do genoma viral

O adenovírus replica o seu genoma no núcleo da célula hospedeira de forma muito eficiente, uma propriedade que tem justificado o seu uso como vector em terapia génica. Quarenta e oito horas após o início da infecção, 10^6 moléculas de ADN viral podem ser sintetizadas, igualando a quantidade de ADN celular. Esta *performance* é ainda mais extraordinária nos serótipos 2 e 5, que apenas iniciam a sua replicação entre as cinco e as dez horas após a infecção. O período que se inaugura com o início da replicação do genoma viral é conhecido por fase tardia da infecção, que sucede à fase inicial (ou precoce) que mostra elevada actividade transcricional das unidades E1A, E1B e E2. Como anteriormente referido, estas unidades codificam proteínas necessárias à replicação viral e proteínas que pervertem o metabolismo celular.

O adenovírus serótipo 2 (Ad2) apresenta um genoma de ADN de cadeia dupla com 36 Kpb. As origens de replicação têm um tamanho de 102 pb e localizam-se nas extremidades 3' e 5' de ambas as cadeias virais. Os seus primeiros cinquenta nucleótidos, por serem repetições de sequências curtas e por se posicionarem de forma invertida, recebem o nome de repetições terminais invertidas (*Inverted Terminal Repeats* - *ITR*). Na parte mais externa destas sequências *ITR* existe a repetição de um tripleto (GTA), seguindo-se-lhe uma região repetitiva e conservada que funciona como

“*core origin*”. Estudos *in vivo* elucidaram que a replicação do genoma viral ocorre em duas fases distintas (Challberg *et al.*, 1980). Na fase I, a síntese de ADN tem início na extremidade 3' de uma das cadeias primitivas e termina na extremidade oposta. Como apenas uma das cadeias primitivas serve de molde, os produtos da fase I são um novo genoma formado por uma cadeia primitiva e uma cadeia sintetizada *de novo*, e uma cadeia primitiva desemparelhada (Fig. 4, Fase I). Na fase II, a cadeia desemparelhada serve de molde após a sua disposição circular, sobrepondo as duas extremidades e respectivas ITR's que passam a mimetizar as extremidades homolaterais emparelhadas de um genoma completo. No fim da fase II, um novo genoma viral é sintetizado de forma semi-conservativa (Fig. 4, Fase II), à semelhança do que é observado na fase I.

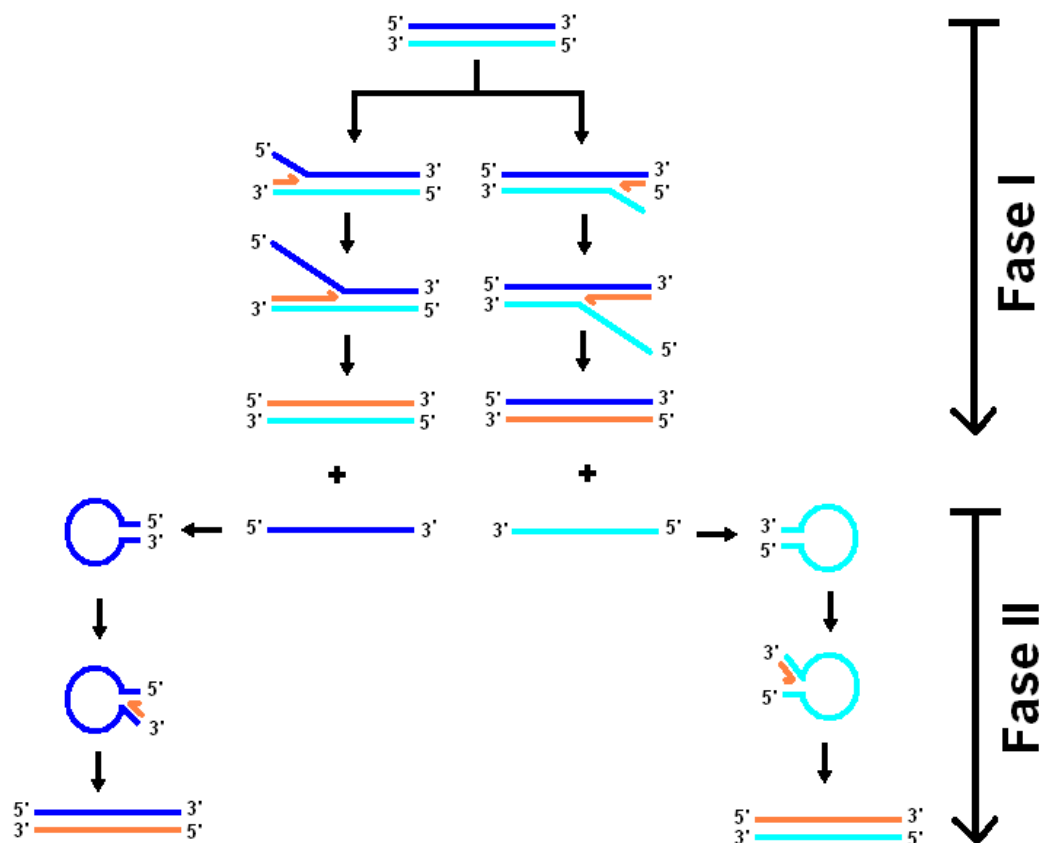


Figura 4 – Modelo da replicação do ADN no adenovírus. Na fase I apenas uma das cadeias primitivas é usada como molde para a síntese semi-conservativa de um novo genoma viral. Após a primeira cadeia ser sintetizada, a fase II tem início com a circularização da cadeia primitiva desemparelhada que sobre põe as suas extremidades de forma a que passem a ser reconhecidas como origens de replicação de duas cadeias complementares. Adaptado de Knipe, D. *et al.*, Fields in Virology, Capítulo 31, 5ª edição, Lippincott Williams & Wilkins. ISSN:0781760607.

A elevada eficiência da replicação deve-se, em parte, às origens de replicação apresentarem ao longo dos primeiros cinquenta nucleótidos, vários domínios repetitivos que funcionam como elementos regulatórios em *cis*. O domínio A limitado aos primeiros dezoito pares de bases, representa a origem de replicação mínima capaz de assegurar a fase de iniciação da replicação viral (Hay, 1985). A sequência presente entre o nono e o décimo oitavo nucleótido (5'-ATAATATACC-3') interage com um complexo viral formado pela proteína pré-terminal (pTP) e pela ADN polimerase (Mul & Van der Vliet, 1992). A proteína pré-terminal (E2, 80 kDa) após interagir com a extremidade 3' da cadeia molde (Challberg *et al.*, 1980 e Stillman *et al.*, 1981), recruta a ADN polimerase viral (E2, 140 kDa) que mostra actividade processiva no sentido 5'→3' e actividade exonucleásica no sentido 3'→5'. O domínio B estende-se entre o décimo nono e o trigésimo nono nucleótido, enquanto o domínio C localiza-se entre o quadragésimo e o quinquagésimo nucleótido. Apesar destes dois domínios não serem indispensáveis à replicação do genoma viral, tornam a fase de iniciação da replicação mais célere ao interagirem com duas proteínas celulares, o factor nuclear I (*Nuclear Factor I - NFI*) que se liga ao domínio B e o factor nuclear II (*Nuclear Factor II - NFII*, 32 kDa) que interage com o domínio C. Desta forma, o *NFI* ao ligar-se à ADN polimerase viral, estabiliza o complexo *pTP*-polimerase junto das origens de replicação, ao mesmo tempo que promove a separação das duas cadeias virais (Tamanoi & Stillman, 1982). Este afastamento das cadeias primitivas é devido, sobretudo, a uma proteína viral chamada proteína de ligação ao ADN (*DNA-Binding Protein - DBP*, 59 kDa) também codificada pela região E2. Imediatamente antes da fase de iniciação ter lugar, o factor nuclear III (*Nuclear Factor III - NFIII*) liga-se à *pTP* através do seu homodomínio POU, induzindo-lhe alterações conformacionais que estabilizam o complexo polimerase-*pTP* (Hatfield & Hearing, 1993 e Botting & Hay, 1999). O *NFIII* que na célula hospedeira é um factor de transcrição (*Oct-1*) volta a colaborar na fase II da replicação viral, ao promover a disposição circular da cadeia primitiva desemparelhada.

Ainda na fase de iniciação, a proteína *pTP* assume uma importância funcional acrescida por assumir o papel de *primer* e, concomitantemente, um papel estrutural por interagir com a matriz nuclear através das proteínas celulares *CAD* (*Carbamoyl-phosphate synthetase-Aspartate transcarbamoylase-Dihydroorotase- CAD*) (Bodnar *et al.*, 1989; Schaack *et al.*, 1990a e Fredman & Engler, 1993). O *primer* é inicialmente formado por uma ligação covalente entre o grupo β-hidroxilo da serina-580 da *pTP* e o

grupo α -fosforilo do monofosfato de desoxicitidina (dCMP) - o primeiro nucleótido da cadeia filha, na presença da ADN polimerase viral e da cadeia molde. A ligação adicional de dois nucleótidos (A e T) leva à formação do complexo pTP-CAT que emparelha, por complementaridade, com o tripleto interno GTA, na posição 4-6. Posteriormente, o *primer* tri-nucleotídico recua três posições emparelhando com os três primeiros nucleótidos da cadeia molde. Este mecanismo, que foi identificado inicialmente no bacteriófago $\phi 29$, permite corrigir eventuais erros que surjam na fase de iniciação, sendo universal nas situações de *protein-priming DNA replication* (Salas *et al.*, 1991 e referências aí contidas). Após a ligação adicional de 3 ou 4 nucleótidos, a polimerase viral separa-se da *pTP* e inicia-se a fase de elongação da replicação.

Durante a fase de elongação são indispensáveis as proteínas DBP, ADN polimerase viral e *NFII* celular. Enquanto a polimerização do ADN decorre, a proteína viral DBP polimeriza-se ao longo da cadeia primitiva que não serve de *template* durante a fase I, forçando a separação progressiva e total das duas cadeias primitivas sem a presença de uma helicase (Tucker *et al.*, 1994 e Dekker *et al.*, 1997). O *NFII* parece facilitar a fase de elongação por participar na resolução de problemas conformacionais do ADN viral, em especial quando as cadeias sintetizadas *de novo* atingem os 9000 nucleótidos de comprimento. Em experiências *in vitro* foi possível substituir o *NFII* pela topoisomerase I (Nagata *et al.*, 1983).

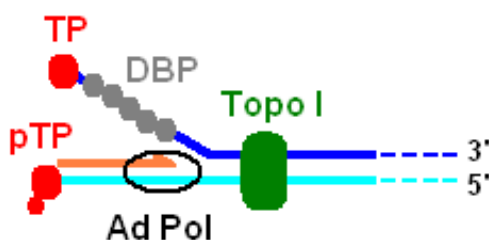


Figura 5 – Representação esquemática da forquilha de replicação viral durante a fase de elongação. Após a ADN polimerase viral (círculo preto) se dissociar da proteína pTP (a vermelho), inicia a síntese processiva no sentido 5'→3'. Simultaneamente, a proteína viral DBP (a cinzento) polimeriza-se ao longo da cadeia primitiva que não serve de molde, afastando as duas cadeias que formam o genoma viral. As topoisomerases I e II reduzem o *stress* torsional que se forma a jusante da forquilha de replicação, tal como na replicação do ADN eucariota.

I.3.3. Papel das topoisomerases na replicação do adenovírus

Apesar do recente aumento da literatura científica sobre o adenovírus nos campos da terapia génica, da viroterapia do cancro e da clínica médica, devido ao número preocupante de mortes causadas por este vírus, o papel biológico das topoisomerases celulares continua por esclarecer.

Em paralelo com outros vírus de ADN (eg, *Herpes simplex I e II*), o adenovírus parece depender das topoisomerases presentes nas células hospedeiras, uma vez que o genoma viral não codifica para nenhuma destas enzimas. Segundo Nagata *et al.* (1983), a topoisomerase I pode substituir o factor nuclear II durante a replicação do adenovírus *in vitro*. Estudos subsequentes, recorrendo ao uso de inibidores irreversíveis (venenos) de topoisomerase I e II sugeriram também um papel funcional para a topoisomerase II durante a replicação (Schaack *et al.*, 1990b). O mapeamento dos locais de clivagem da topoisomerase I e das topoisomerases de tipo II permitiu concluir que os locais eram sobreponíveis, embora a frequência de corte da topoisomerase I fosse muito superior. Adicionalmente, Schaack *et al.* (1990b) mostrou que a incubação com camptotecina inibia quase de imediato a replicação do vírus, enquanto altas concentrações de etoposido reduziam a replicação viral em 50%, ao fim de trinta minutos de incubação. Esta diferença poderá ser justificada pela replicação do adenovírus ocorrer em cadeias desemparelhadas (evento que deve ser muito dependente da actividade da topoisomerase I) ou por as topoisomerases de tipo II apenas serem necessárias na fase final da replicação, onde deverão resolver os problemas topológicos de milhões de genomas virais sintetizados *de novo* (Wong & Hsu, 1989).

Em resumo, apesar das evidências existentes apontarem para a topoisomerase I ser a principal enzima celular envolvida na replicação do adenovírus *in vivo*, e a única *in vitro*, o facto dos estudos disponíveis terem recorrido a concentrações altíssimas de venenos citotóxicos, dos mapas de clivagem resultarem da actividade de transcrição e de replicação virais e de não discriminarem as actividades isoladas das isoformas α e β , tem aumentado as dúvidas sobre o fenómeno da replicação. Por outro lado, as frugais evidências bioquímicas colhidas até à data não foram corroboradas por outras abordagens experimentais (estudos imunocitoquímicos, análise de células vivas por microscopia, silenciamento de ARN, etc.).

I.4. Objectivos da investigação

O principal objectivo da nossa investigação foi perceber qual a função das topoisomerasas I, II α e II β na replicação, utilizando o adenovírus como modelo. Como foi referido anteriormente, o programa de replicação do adenovírus apresenta uma dinâmica temporo-espacial bem conhecida, facilitando o estudo das proteínas que participam neste fenómeno. O número muito reduzido de estudos *in vivo* que investigaram o papel das topoisomerasas celulares na replicação, através do uso de drogas anti-topoisomerase com múltiplos efeitos citotóxicos, justificam o estudo que aqui apresentamos. Os objectivos delineados para o nosso trabalho foram os seguintes:

- 1) Observação e caracterização microscópica dos padrões de distribuição das topoisomerasas I, II α e II β em células infectadas;
- 2) Caracterização funcional das acumulações de proteína topoisomerasica;
- 3) Análise mutacional do domínio N-terminal e do resíduo catalítico da topoisomerase I no recrutamento *in vivo*;
- 4) Titulação das concentrações celulares e das actividades catalíticas das topoisomerasas I, II α e II β antes e durante a replicação dos genomas virais;
- 5) Quantificação dos genomas virais presentes em células depletadas selectivamente de topoisomerasas I, II α ou II β .

CAPÍTULO II

Material e métodos

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Anticorpos e drogas

Os seguintes anticorpos foram usados para a imunodeteção específica de diferentes antígenos, nas diluições indicadas entre parêntesis: auto-anticorpo humano anti-topoisomerase I (#106; gentilmente cedido pelo Professor Walter van Venrooij, Katholiek Universiteit, Nijmegen; Holanda; 1:500); anticorpo policlonal de coelho anti-topoisomerase I humana (TopoGEN, Inc, Columbus, Ohio, EUA; 1:200-1000); anticorpo monoclonal anti-topoisomerase II α humana - clone 3D4 (Stressgen Biotechnologies Corp., Victoria, British Columbia, Canadá; 1:80) e clone Ki-S1 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, EUA; 1:200); anticorpo policlonal de coelho anti-topoisomerase II β humana (ab 15565, Abcam, Cambridge, Inglaterra; 1:100), anticorpo monoclonal anti-BrdU (clone BU-33, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; 1:100); anticorpo policlonal de coelho para imunodeteção da proteína adenoviral DBP (cedido gentilmente pelo Prof. T. Linné, Uppsala University, Uppsala, Suécia; 1:200); anticorpo monoclonal anti- β -actina (clone ac-15, Sigma-Aldrich, 1:5000). Os anticorpos secundários usados nos procedimentos imunocitoquímicos subsequentes, purificados por afinidade e conjugados com FITC (1:200), Texas Red (1:200) e Cy5 (1:300), foram adquiridos à Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, EUA).

Foram utilizados os fármacos 5-bromo-2-deoxi-uridina (BrdU), 5-bromo-uracilo (BrU), 5,6- diclorobenzimidazol 1 β -D-ribofuranosido (DRB), emetina, hidroxiureia (HU), 1-(β -D-Arabinofuranosil)citosina (AraC), camptotecina (CPT) e etoposido (ETOP) e o corante 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) todos adquiridos à Sigma-Aldrich; o inibidor de proteossoma MG-132 foi comprado à Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanha. Para a marcação directa da replicação viral usámos o nucleótido modificado ChromaTide Texas Red-12-dUTP (Invitrogen Corp./Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). A quantificação da actividade enzimática das topoisomerasas I e de tipo II foi realizada por *kits* comerciais da TopoGEN Inc. (Port Orange, FL, EUA).

II.2. Cultura de células, infecção viral e microinjecção celular

As células de mamífero utilizadas durante os nossos estudos foram as células humanas HeLa (ATCC, Rockville, MD, EUA). O meio de cultura usado foi o *Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM* (Life Technologies, Rockville, MD), enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 1% de aminoácidos não-essenciais e 50 µg/ml de gentamicina ou penicilina/estreptomicina a 100 unidades/ml (Invitrogen/Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA). As células foram cultivadas em monocamada e mantidas a 37 °C, numa atmosfera humedecida e com 5% de CO₂.

As infecções experimentais foram feitas com a estirpe selvagem (*wild type*) do Adenovírus subtipo 2, a uma multiplicidade de infecção entre as 20 e as 30 unidades formadoras de focos por célula. Inicialmente, as culturas celulares foram incubadas com uma diluição viral feita em meio DMEM sem soro fetal e, após um período de incubação de 1 hora, o meio foi removido e as células foram lavadas 2 a 3 vezes com meio de cultura novo e aquecido, de forma a arrastar o vírus não ligado, tornando a infecção viral o mais síncrona possível. Até ao término da experiência, novo meio DMEM suplementado com 10% de soro foi adicionado às culturas celulares.

Nas experiências que envolveram a microinjecção nuclear de nucleótidos modificados (ChromaTide Texas Red-12-dUTP[®] e 5-bromo-uracilo), foi feita a sua diluição prévia à razão de 1:10, numa solução aquosa isotónica com 5 mM HEPES e 100 mM KCl, pH 7,5. De forma a evitar o entupimento do capilar da agulha, a solução foi centrifugada a 15000 rpm durante 20 minutos, antes do seu carregamento com pontas de pipetas para microinjecção (Femtotips[®], Eppendorf, Hamburg, Alemanha). As agulhas de microinjecção foram preparadas no aparelho Model P-87 Brown-Flaming Micropipette Puller (Sutter Instruments Company, Novato, CA, EUA), sendo a microinjecção realizada com o auxílio de um microscópio óptico invertido (Zeiss IM, Carl Zeiss), ligado a um micromanipulador (Modelo MR) e a um microinjector (Modelo 5242, ambos da Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Os nucleótidos modificados foram microinjectados no núcleo de células HeLa que cresciam em lamelas com grelha (CELLocate microgrid coverslip, Eppendorf), 16 horas após a infecção viral. Posteriormente, as células foram lavadas com meio de cultura pré-aquecido e incubadas 30 minutos a 37°C, antes de serem fixadas, de forma a que os nucleótidos injectados

fossem incorporados no ADN viral sintetizado *de novo*. Em cada experiência, apesar de 15 a 20 células serem microinjectadas, um número menor foi alvo de análise microscópica, pois um número apreciável destacava-se da lamela, assumia morfologia anormal ou apresentava injeção citoplasmática concomitante.

II.3. Microscopia e análise de imagem

Para a imunodeteção de antígenos celulares ou virais e posterior observação por microscopia de fluorescência, as células HeLa infectadas foram fixadas e extraídas simultaneamente com uma solução de paraformaldeído a 3,7% em tampão HPEM (30 mM HEPES, 65 mM Pipes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, pH 6,9), com Triton-X-100 a 0,5% (Sigma), pH 7,4, durante 10 minutos, à temperatura ambiente e com agitação suave.

A imunodeteção da fracção catalítica activa das topoisomerasas I, II α e II β envolveu um ensaio microscópico semi-quantificativo com resolução sub-celular, desenvolvido pelo nosso grupo de trabalho, denominado “*Differential Retention of Topoisomerase assay – DRT assay*” (Agostinho *et al.*, 2004). Neste ensaio, as células HeLa infectadas foram incubadas com um veneno específico para a Topo I (CPT) e/ou um veneno específico para a Topo II (ETOP), induzindo-se a formação de complexos estáveis ADN-enzima-veneno. As células do grupo controlo foram incubadas com os solventes dos venenos e processadas em paralelo. Após o curto período de incubação com o(s) veneno(s) específico(s) (10-20 minutos), as células foram lavadas com PBS e subsequentemente extraídas em tampão HPEM 1x contendo 350 mM NaCl, 0,5% Triton X-100 e inibidores de proteases (1 mM PMSF e um comprimido de Complete Mini EDTA-free, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). O tampão de extracção foi sempre usado a 4°C e a extracção realizada sobre o gelo, durante 2 minutos e em agitação ligeira. Por último, as células foram fixadas numa solução de formaldeído a 3,7%, diluído em HPEM 1x, durante 10 minutos e à temperatura ambiente.

Nos casos em que foi necessário recuperar o antígeno, as células, depois de fixadas e permeabilizadas foram fervidas em tampão citrato a 10 mM, pH 6,0, durante 60 segundos. De seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS durante 10 minutos e incubadas com os anticorpos primários. As diluições dos anticorpos primários

e secundários, e as lavagens durante os procedimentos da técnica de imunocitoquímica foram efectuadas com tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma). A coloração do ADN foi realizada por incubação das células com uma diluição de DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), durante 10 minutos. Antes da análise microscópica cada lamela foi montada em meio de montagem Vectashield® (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA).

As amostras biológicas foram analisadas por microscopia confocal num microscópio Zeiss LSM (Laser Scanning Microscope) 510 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com um *laser* Argon Ion (488nm) de forma a excitar o conjugado FITC e um *laser* de Helium/Neon com linhas de excitação a 543nm e 630 nm para os conjugados Texas Red e Cy5, respectivamente. A informação obtida dos diferentes canais foi colhida separadamente usando filtros de espectro apertados e, em experiências de imunomarcacão dupla ou tripla, as intensidades do *laser* foram ajustadas de forma a evitar a passagem de fluorescência entre canais. As imagens obtidas resultam da média das intensidades de 4 imagens com a resolução de 1024x1024 pixéis e uma abertura do *pinhole* entre as 1,05-1,10 unidades. Os dados foram processados usando o *software* Zeiss 510, versão 2.8 (Carl Zeiss) e as imagens foram posteriormente trabalhadas no programa de gráficos Adobe Photoshop, versão 7.0 (Adobe Systems, Inc., CA, EUA).

II.4. Técnica de *Western Blot*

Na preparação de extractos celulares totais, a partir de células HeLa cultivadas em caixas de Petri com 35 mm de diâmetro (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Alemanha), foi efectuada a adição de tampão-amostra (200 mM Tris/HCl, pH 6,8, 8% SDS, 0,4% azul de bromofenol, 40% glicerol e 167 mM ditioneitol). Após a adição deste tampão-amostra às células, estas foram removidas do fundo das caixas de Petri com o auxílio de um *cell scraper* (Sarstedt AG & Co), e a suspensão obtida foi aquecida a 95 °C durante 15 minutos, antes da electroforese propriamente dita. A separação das proteínas foi realizada em géis de 8% ou de 10% de SDS-poliacrilamida (Sigma) e, posteriormente, foram electrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Schleicher & Schuell, Keene, NH, EUA). Após três lavagens de cinco minutos com PBS as membranas foram bloqueadas com uma solução de PBS/5% leite magro em pó durante

uma hora, e incubadas com os anticorpos primários específicos diluídos em PBS/2,5% de leite magro em pó, pelo tempo mínimo de uma hora. O anticorpo policlonal de coelho anti-topoisomerase I humana (ab3825, Abcam, Cambridge, Inglaterra; 1:1000), o anticorpo monoclonal anti-topoisomerase II α humana, (clone Ki-S1, Boehringer Mannheim; 1:1000), dois anticorpos monoclonais contra o *tag* GFP (Boehringer Mannheim; 1:2000), o anticorpo monoclonal contra a proteína do adenovírus E1A (clone M73, EMD Biosciences Inc./Calbiochem, San Diego, CA, EUA; 1:1000), o anticorpo monoclonal anti- β -actina, (clone ac-15, Sigma-Alrich), o anticorpo monoclonal anti-SUMO1 (ab11672, Abcam), o anticorpo policlonal de coelho anti-SUMO2/3 (ab3742, Abcam) foram usados como anticorpos primários. Após incubação com os anticorpos primários, as membranas de nitrocelulose foram lavadas 3 x 15 minutos em PBS/2,5% de leite magro em pó e incubadas 2 horas com as diluições dos anticorpos secundários: IgG anti-coelho e IgG anti-rato, ambos conjugados com a peroxidase de rábano (*Horseradish Peroxidase – HRP*) e purificados por afinidade (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Por fim, as membranas foram lavadas durante 2 a 3 horas com PBS e reveladas com um sistema que utiliza a quimioluminescência (ECL, Amersham Biosciences Buchler GmbH, Braunschweig, Alemanha), seguida da sua exposição a película radiográfica (Kodak Biomax Scientific Imaging Film, Eastman Kodak, Rochester, NY, EUA).

II.5. Construção e expressão de proteínas de fusão

As construções GFP-TopoI^{wt}, GFP-TopoI^{Y723F}, GFP-TopoI^(Δ 1-138), GFP-TopoI^{(Δ 1-209)^{wt}}, GFP-TopoI^{(Δ 1-209) Y723F}, CFP-TopoI⁽¹⁻²¹⁰⁾, CFP-TopoI^(1-210-3k's) contêm a totalidade ou parte do *cADN* que codifica para a topoisomerase I humana, obtido a partir de uma biblioteca de *cADN* de testículo.

A construção GFP-TopoI^{wt} resultou da sub-clonagem de um produto obtido por PCR (Polymerase Chain Reaction), nos locais de corte reconhecidos pelas enzimas de restrição *EagI* e *BamHI* (Fermentas, Hanover, MD, EUA) no vector pEGFP-C2 (Clontech, Mountain View, CA, EUA). Os *primers* usados na reacção de PCR foram: *wt Fwd* (5'- CTCCCGGCCGCATGAGTGGGGACCACC-3') e *wt Rev* (5'- CCACACGGATCCTCTTCACAGAACTCT-3'); o codão de iniciação é indicado a

negrito. A construção mutante GFP-TopoI^{Y723F} foi obtida a partir da construção GFP-TopoI^{wt}. A mutação pontual criada pela substituição da tirosina na posição 723, por uma fenilalanina, foi feita com o Kit de Mutagénese Direccionada (“QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit”, Stratagene, La Jolla, CA, EUA). Os *primers* usados na reacção de PCR para amplificação do produto foram: *Y723F Fwd* (5'-CCTCCAAACTCAAT**TT**CCTGGACCCTAGGATC-3') e *Y723F Rev* (5'-GATCCTAGGGTCCAGG**AA**ATTGAGTTTGGAGG-3'), sendo os nucleótidos alterados indicados a negrito. O fragmento obtido após o corte com HindIII/BamHI e que contém a mutação foi incorporado no plasmídeo pEGFP-C2. O mutante GFP-TopoI^(Δ1-138) foi construído usando a construção GFP-TopoI^{wt} como *template*. Foi eliminada a porção de ADN que compreende os primeiros 414 nucleótidos por PCR. Os mutantes GFP-TopoI^{(Δ1-209)wt} e GFP-TopoI^{(Δ1-209) Y723F} foram construídos a partir das sequências GFP-TopoI^{wt} e GFP-TopoI^{Y723F}, respectivamente. Ambos os mutantes foram sub-clonados a partir de produtos de PCR como *primers*: *(Δ1-209) Fwd*: 5'-TACAAGAATTCACCTAAGAAGAAGCGAAAGGTCTATCCTGAAGGCATCAAGTC-3' acrescido de um SV40 NLS e o *primer wt Rev* (descrito acima). Os fragmentos obtidos foram religados pelas EcoRI e BamHI ao vector pEGFP-C2. As construções CFP-TopoI⁽¹⁻²¹⁰⁾ e CFP-TopoI^(1-210-3k's) foram clonadas como produtos de PCR usando a sequência GFP-TopoI^{wt} como *template*, os *primers*: *1-210 Fwd* (5'-CAAGAATTC**CA**TGAGTGGGGACCACC-3') e *1-210 Rev* (5'-CTTGGATCCAGCGCTCTTCTTCCCACCAT-3') e os locais de corte reconhecidos da EcoRI e da BamHI no plasmídeo pECFP-C1 (Clontech); o codão de iniciação é indicado a negrito. Por último, na construção CFP-TopoI^(1-210-3k's) que apresenta três mutações pontuais, devido à substituição de uma lisina por uma arginina, nas três sequências consenso para a SUMOilação por SUMO-1 presentes no domínio N-terminal da topoisomerase I, foram usados os *primers*: K103R Fwd, K103R Rev, K117R Fwd, K117R Rev, K153R Fwd and K153R Rev. Inicialmente descritos por Rallabhandi *et al.* (2002), os *primers K153R Fwd* e *K153R Rev* foram alterados no nucleótido 648 (de T para C) de forma a coincidirem com o *cADN* da TopoI. As mutações pontuais nas lisinas, presentes nas 3 sequências de consenso para a SUMOilação, foram geradas por mutagénese dirigida usando QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene).

Os plasmídeos com as construções EGFP-Topo II α^{wt} e EGFP-Topo II α^{Phe805} usados neste trabalho foram uma generosa oferta do Prof. William Beck (University of Chicago, IL, EUA) e foram inicialmente descritos por Mo e Beck (1999). Todas as construções foram verificadas e validadas por sequenciação. Os ADNs finais foram purificados com QIAGEN Plasmid Midi Kit (Valencia, CA, EUA), dissolvidos em água miliQ e guardados a -20°C.

A transfecção das células HeLa foi realizada usando o reagente FuGENE 6 (Roche Diagnostics) e respeitando o protocolo do fabricante. Passadas 24 horas de expressão, as culturas celulares foram infectadas com o adenovírus, sendo os níveis de expressão e a localização das várias proteínas de fusão analisados às 14 e às 20 horas pós-infecção.

II.6. Técnica de silenciamento proteico por RNA de interferência (RNAi)

A transfecção de células HeLa com oligonucleótidos que reconhecem sequências específicas e codificantes do ARN mensageiro das topoisomerases I, II α e II β (Tabela III) foi realizada usando como agente de transfecção a oligofectamina (Invitrogen Corp.). Sumariamente, 2 a 4 horas após a passagem das células HeLa para caixas de Petri com 35 milímetros de diâmetro e de forma a terem com um grau de confluência de ~50%, foram incubadas com 2 μ l do *si*RNA duplex específico (20 μ M) previamente diluído em 183 μ l de meio Opti-MEM I (Invitrogen Corp.) e 4 μ l do reagente OligoFectamine® em 11 μ l de meio Opti-MEM I. Foi este volume final de 200 μ l contendo *si*RNA, OligoFectamine® e Opti-MEM I que foi adicionado a cada caixa de células com 800 μ l de meio MEM suplementado com 10% soro fetal bovino. No dia seguinte, a mistura de depleção foi removida e novo meio de cultura foi adicionado às células. Antes da infecção viral, de forma a obtermos níveis de depleção de 75% para as topoisomerases I, II α e II β , foram necessários 2 ciclos adicionais de redepleção para a primeira proteína, e apenas uma nova redepleção para as duas últimas.

Tabela III – Sequências de oligonucleótidos efectivas e de controlo usadas no silenciamento da topoisomerase I, II α e II β .

Proteína-alvo	siRNA	Controlo do siRNA
Topoisomerase I	5'-GAG-GGC-AAG-UGG-AUG-GGA-AUU-3'	5'-ACG-GGA-UUG-GAA-GGG-AGA-GUU-3'
	5'-CUU-GAC-AGC-CAA-GGU-AUU-CUU-3'	5'-GAG-UCA-CGA-GUC-UUA-UAC-CUU-3'
Topoisomerase II α	5'-GCA-CAU-CAA-AGG-AAG-CUA-AUU-3'	5'-GGC-AAG-ACU-CAA-GAA-UCA-AUU-3'
	5'-GCC-AUC-CAC-UUC-UGA-UGA-UUU-3'	5'-GAU-CCC-CUC-ACU-UGA-UUG-AUU-3'
	5'-GAC-UGU-CUG-UUG-AAA-GAA-UUU-3'	5'-GAU-CGU-CUU-UGG-AUA-AGA-AUU-3'
Topoisomerase II β	5'-ACG-AAA-GAC-UGC-CGA-AGA-UUU-3'	5'-GAA-GAG-UCA-GAA-ACU-GCC-AUU-3'
	5'-GUU-ACC-ACC-GUA-ACA-ACA-CUU-3'	5'-CCA-ACC-AGA-UCU-GUC-CAA-AUU-3'

II.7. “*Fluorescence Recovery After Photobleaching*” (FRAP) e análise de imagem

Para a realização desta técnica avançada de microscopia, foram cultivadas células HeLa em caixas de Petri com o fundo em vidro (MatTek, Ashland, MA, EUA). Seis horas após a sua passagem, as células foram transfectadas transitoriamente com 1 μ g de GFP-TopoI^{wt}, GFP-TopoI^{Y723F}, GFP-TopoII α e GFP-TopoII α ^{Y805F} usando o FuGENE 6 (Roche Diagnostics) como reagente de transfecção e seguindo as instruções do fabricante. Após 24 horas de expressão, as células foram infectadas com a estirpe natural (*wt*) do adenovírus subtipo 2 e 16 horas mais tarde, procedeu-se à mudança de meio de cultura para Dulbecco's-MEM/F-12 sem vermelho de fenol (Invitrogen Corp.), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 15 mM de tampão HEPES, pH 7,4.

De forma a obtermos dados correctos acerca da localização e da mobilidade das várias proteínas de fusão e a evitar distorção dos resultados pela manipulação experimental, apenas prosseguimos com o estudo *in vivo* das células que mostrassem baixos níveis de expressão das proteínas em estudo e que possuísem morfologia celular normal. Para que o estudo decorresse a 37 °C, acoplámos uma câmara de aquecimento (LaCon, Staig, Alemanha) e usámos uma resistência térmica para provocar o aquecimento da objectiva (PeCon, Erbach, Alemanha). As imagens foram adquiridas no

microscópio confocal LSM 510 (Carl Zeiss), com uma objectiva de imersão em óleo Planapochromat 63X/1.4 aquecida. A fluorescência GFP foi detectada usando o *laser* de Argon (488 nm) a 25% do *output* nominal de 25-mW, em conjugação com o filtro LP 505.

Cada experiência de *FRAP* iniciou-se com três imagens simples da célula em estudo, seguidas de um pulso de *laser* com a duração de 105 ms e cinco interações, numa área circular de 25 pixéis de diâmetro (1,42µm de raio). Séries de 36 imagens seccionadas (512 x 50 pixéis) foram colhidas com intervalos de 5 segundos e com a intensidade de *laser* atenuada a 1%. Para cada série temporal, os dados de *FRAP* foram corrigidos para a intensidade de *background* extracelular e para a perda de intensidade de fluorescência resultante do pulso de *laser* e/ou dos *scans* realizados para obtenção de imagens. A curva de recuperação de *FRAP* foram normalizadas de acordo com Phair e Misteli (2000) e todos os procedimentos de alinhamento foram efectuados com a função “*NonLinearRegress*” do *software* Mathematica 4.0 (Wolfram Research, Champaign, IL, EUA). O algoritmo de segmentação usado foi previamente publicado por Calapez *et al.* (2002) e por Braga *et al.* (2004), e foi desenvolvido no *software* Matlab (Mathworks, Natick, MA, EUA).

II.8. Electroforese de campo-pulsado em gel (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis – PFGE*)

Após a depleção com sucesso das topoisomerasas I, II α e II β , as células foram infectadas com adenovírus e colhidas às 10 e às 16 horas pós-infecção. De seguida, as células foram destacadas do fundo das caixas de Petri por tripsinização e 4x10⁵ células foram incorporadas por disco de agarose de baixo ponto de fusão (*LMP agarose*, NuSieve GTG agarose, BMA, Rockland, ME, EUA). Após solidificação, os discos de cada grupo experimental foram incubados com tampão de lise [125 mM EDTA, 1,2% SDS e proteinase K (5 mg/ml, Sigma-Aldrich), pH 8,0] durante 24 horas e à temperatura de 50 °C. Posteriormente, os discos de agarose foram lavados extensivamente com tampão Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 50 mM EDTA, pH 8,0). O ADN retido nos discos de agarose foi separado por tamanho, num gel de agarose a 1% (Biorad, Hercules, CA, EUA), usando o tampão 0,5xTris-Borato-EDTA (Biorad)

como tampão de corrida. O equipamento de electroforese utilizado foi o CHEF DR II (Biorad) e as seguintes condições de corrida: 120° de ângulo do campo eléctrico; 1-2 segundos na mudança da direcção da corrida; voltagem de 6 V/cm; temperatura de corrida 14 °C e tempo de corrida de 16 horas. A temperatura do tampão de corrida foi mantida a 14 °C devido ao uso de um banho de arrefecimento (FrigoMix U; B. Braun, Melsungen, Alemanha). Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados num transiluminador de raios UV de alta performance (modelo Kodak EDAS 290, Eastman Kodak Company, New Haven, CT, EUA) e posteriormente analisados num leitor de fluorescência (Typhoon 9210, Amersham, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, EUA), operado pelo *software* Image Quant, versão 5.2 (Molecular Dynamics).

CAPÍTULO III

Resultados

III. RESULTADOS

III.1. As topoisomerases I, II α e II β são recrutadas para os locais de replicação e de transcrição do adenovírus

Experiências de hibridação *in situ* revelaram que a replicação do genoma viral induz alterações morfo-funcionais na estrutura nuclear. Segundo Puvion-Dutilleul e Pichard (1992), e Besse e Puvion-Dutilleul (1994), os focos de replicação viral distribuem-se aleatoriamente no nucleoplasma, formando pequenas regiões fibrilares que contêm ADN viral de cadeia dupla e cadeia simples. Assim, no início da fase tardia de infecção (8-10 horas p.i), a replicação e a transcrição virais ocorrem exclusivamente no interior destas estruturas que são conhecidas como “fábricas” virais. Desta forma, fábricas virais aumentam rapidamente de tamanho por acumularem ADN viral de cadeia simples e proteína viral DBP, apresentando uma forma de crescente, anelar ou esferóide. A partir das 12-14 horas após o início da infecção, a replicação e a transcrição virais compartimentalizam-se, assumindo uma distribuição em anel. Nesta fase, a replicação apresenta-se mais próxima das acumulações da proteína DBP e a transcrição mais afastada (Fig. 6) devido à migração radial dos genomas virais completos.

Embora vários trabalhos tenham demonstrado que o adenovírus perverte o funcionamento da célula hospedeira por modular a expressão de várias proteínas celulares (Pombo *et al.*, 1994 e Gama-Carvalho *et al.*, 1997), não existem, até à data, estudos citológicos sobre a localização das topoisomerases em células infectadas. Como foi referido na introdução, ainda não foi possível obter evidências sólidas de que a topoisomerase I e as topoisomerases de tipo II participem na replicação e na transcrição viral. Uma vez que a intensa replicação e a transcrição virais deverão gerar problemas conformacionais (de topologia) nos genomas virais, começámos por testar se a distribuição das topoisomerases I, II α e II β sofria alteração na célula infectada. Para a realização de imunomarcações duplas e porque a replicação e a transcrição viral decorrem em locais subnucleares próximos, o que pode gerar problemas de *steric hindrance* (impedimento estereoquímico) que surgem quando anticorpos competem por epitopos espacialmente próximos, transfectámos proteínas de fusão (GFP-Topoisomerase I e GFP-Topoisomerase II α) para visualização directa de formas fluorescentes das topoisomerases.

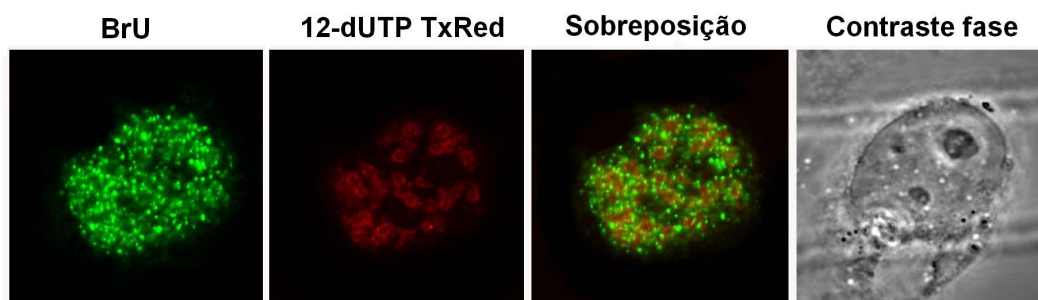


Figura 6 – Morfologia dos locais de replicação e de transcrição do adenovírus em células HeLa.

Durante a fase tardia de infecção viral, os locais de replicação e de transcrição virais assumem uma morfologia em anel, com a transcrição viral a ocorrer à periferia dos centros replicativos. A detecção directa da replicação foi realizada por microinjecção intranuclear de um nucleótido modificado ChromaTide Texas Red-12-dUTP (a vermelho) e a transcrição viral por microinjecção intracitoplasmática de um análogo halogenado do uracilo (BrU). O BrU incorporado foi detectado com um anticorpo primário monoclonal anti-BrdU (clone BU-33, Sigma) e por um anticorpo secundário anti-ratinho conjugado com FITC (a verde).

A análise de células infectadas por microscopia confocal permitiu concluir que a distribuição nucleoplasmática difusa das três topoisomerasas só é alterada após o adenovírus iniciar a replicação do seu genoma. Na figura 7, mostramos a localização das topoisomerasas I e II α numa célula não infectada (1ª linha) e numa célula infectada (2ª linha). O recrutamento das topoisomerasas celulares para junto das acumulações de DBP e o desaparecimento da marcação nucleoplasmática e nucleolar levou-nos a estudar com mais pormenor, a distribuição destas proteínas ao longo da infecção.

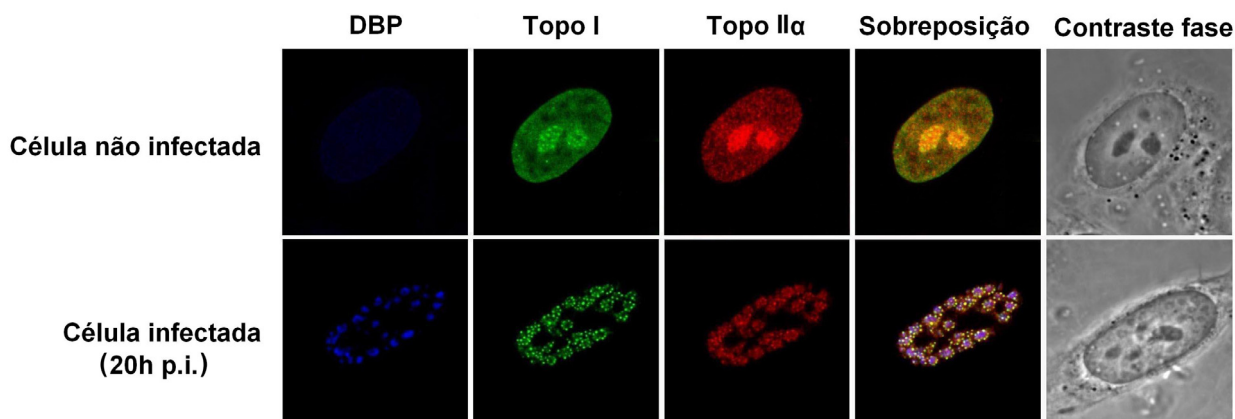


Figura 7 – Os padrões de distribuição nuclear das topoisomerases I e II α mudam de forma dramática em células HeLa infectadas com adenovírus. A distribuição nucleoplasmática difusa e a intensa marcação nucleolar das topoisomerases I (a verde) e II α (a vermelho) nas células não infectadas (1ª linha), dão lugar a acumulações anelares que rodeiam os focos da proteína viral DBP (a azul) nas células infectadas pelo adenovírus.

A observação dos padrões de distribuição das topoisomerases I, II α e II β durante a fase inicial de infecção (i.e. entre as 0 e as 8 horas após o início da infecção) não revelou diferenças comparativamente às células não infectadas. Nas primeiras horas da fase tardia de infecção (8-12 horas p.i.), as topoisomerases I, II α e II β perdem progressivamente as marcações nucleolar e nucleoplasmática difusa, que são substituídas por acumulações punctiformes em pequenos domínios subnucleares que se sobrepõem aos focos de DBP (fábricas virais) (Fig. 8, 1ª e 2ª linhas e Fig. 9, 1ª linha). No período intermédio da fase tardia (entre as 12 e as 20 horas após a infecção), as fábricas virais tornam-se mais proeminentes e as topoisomerases passam a apresentar uma distribuição anelar em seu redor (Fig. 8, 3ª e 4ª linhas e Fig. 9, 2ª e 3ª linhas). Na fase final da fase tardia da infecção (24h-40h p.i.), o padrão anelar de distribuição das topoisomerases é substituído por um padrão *speckled* inter-anelar que mimetiza a organização dos factores de *splicing* (Fig. 9, 4ª linha, 4G3, setas brancas), sem contudo mostrar sobreposição.

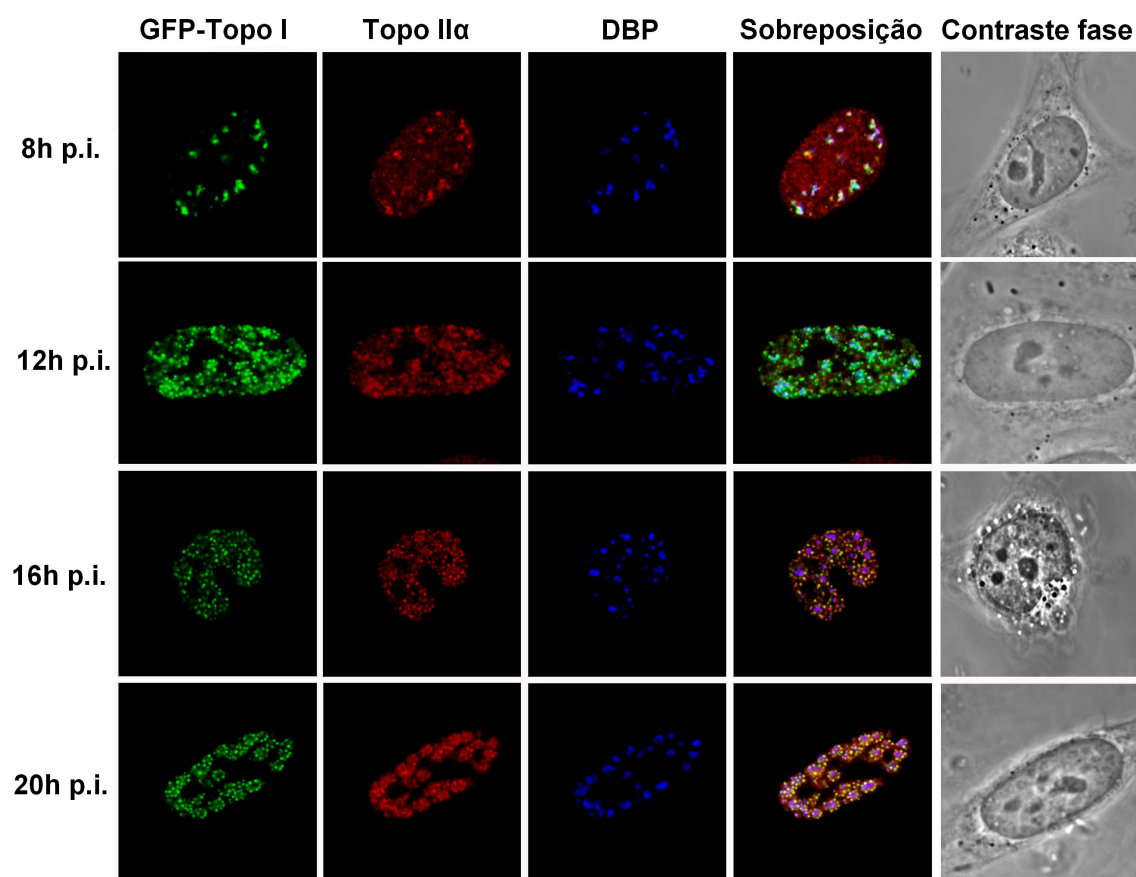


Figura 8 – Redistribuição das topoisomerases I e IIα durante a fase tardia da infecção em células HeLa. No início da fase tardia (8-12 horas após a infecção), a GFP-Topoisomerases I (a verde) e a topoisomerase IIα (a vermelho) são recrutadas pelo adenovírus para domínios subnucleares que se sobrepõem aos sítios de acumulação da proteína DBP (a azul). A manutenção das fracções nucleoplasmáticas e nucleolares da topoisomerase I e da topoisomerase IIα é limitada a este período (8-12h p.i.). Durante o período intermédio da fase tardia (12-20 horas após a infecção), as topoisomerases I e IIα concentram-se à periferia das fábricas virais (focos de DBP) segundo um padrão anelar.

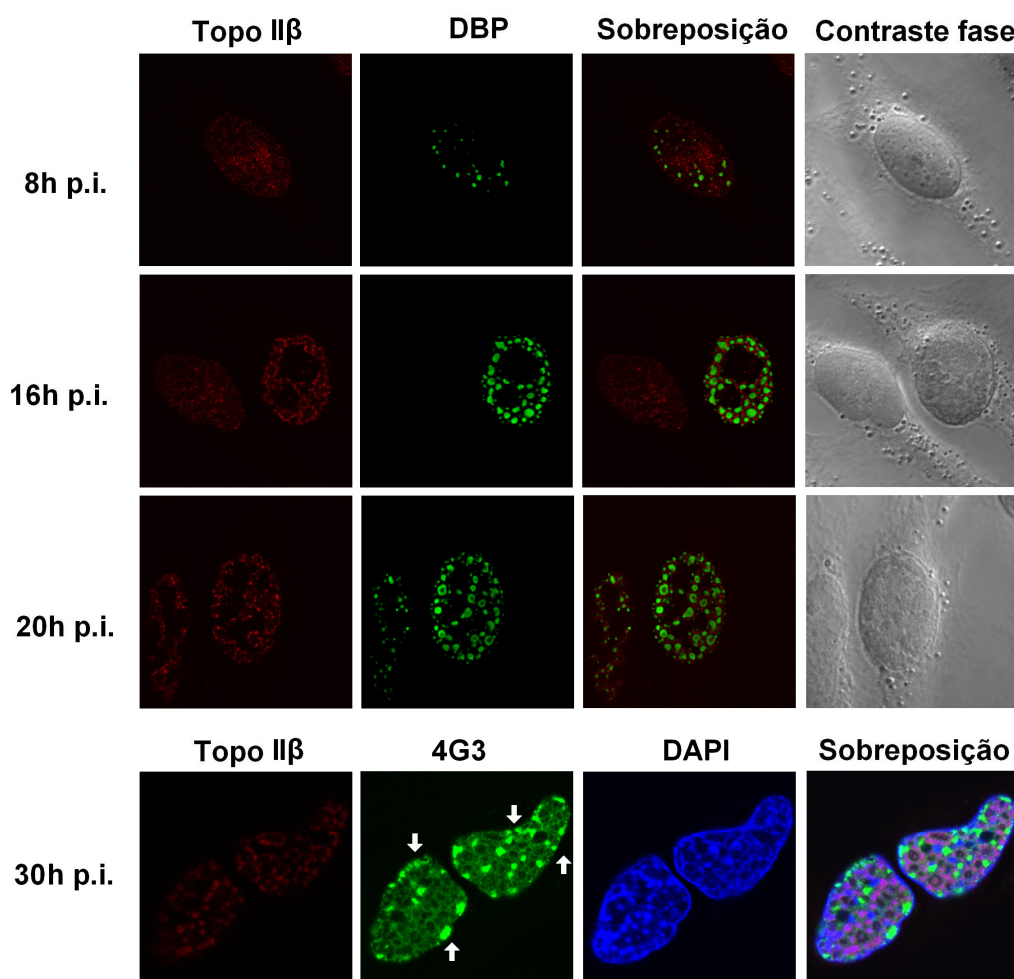


Figura 9 – Padrões de distribuição da topoisomerase II β durante a fase tardia da infecção em células HeLa. No início da fase tardia (8-12 horas após a infecção), o recrutamento da topoisomerase II β (a vermelho) para junto das fábricas virais (marcadas para DBP; a verde) é muito ténue (1ª linha). Com o avançar da infecção, a topoisomerase II β mostra um padrão anelar em redor das acumulações de DBP (2ª e 3ª linhas). Após as 30 horas de infecção, o padrão anelar das topoisomerases é substituído progressivamente por um padrão tipo *speckled*, após a organização dos factores de *splicing* num padrão semelhante (4ª linha, 4G3, setas brancas).

Apesar das complexidades topológicas formadas durante a replicação do genoma viral justificarem a redistribuição intranuclear das topoisomerases I, II α e II β , o facto das acumulações anelares se estenderem para além dos focos de DBP sugere que estas proteínas possam participar noutros eventos virais que ocorrem à periferia dos locais de replicação como a transcrição, o super-enrolamento do genoma viral ou o empacotamento do genoma.

Testámos de seguida a co-localização das topoisomerases com os locais de replicação viral através da microinjecção intranuclear de um nucleótido fluorescente precursor do DNA (ChromaTide Texas Red-12-dUTP). A análise por microscopia confocal revelou que a localização das topoisomerases se sobrepõe parcialmente aos locais de replicação viral, estendendo-se para além dos focos replicativos (Fig. 10). Em seguida, detectámos a transcrição viral por microinjecção intracitoplasmática de 5-bromo-uracilo (BrU), um análogo halogenado do uracilo que é incorporado nos transcritos virais sintetizados *de novo*. As imunomarcações duplas para BrU + Topo I e BrU + Topo II α mostraram co-localizações parciais entre as topoisomerases e a transcrição viral (Fig. 11), o que argumenta a favor da participação destas enzimas noutros fenómenos virais para além da replicação viral (Schaak *et al.*, 1990 e Wong & Hsu, 1990).

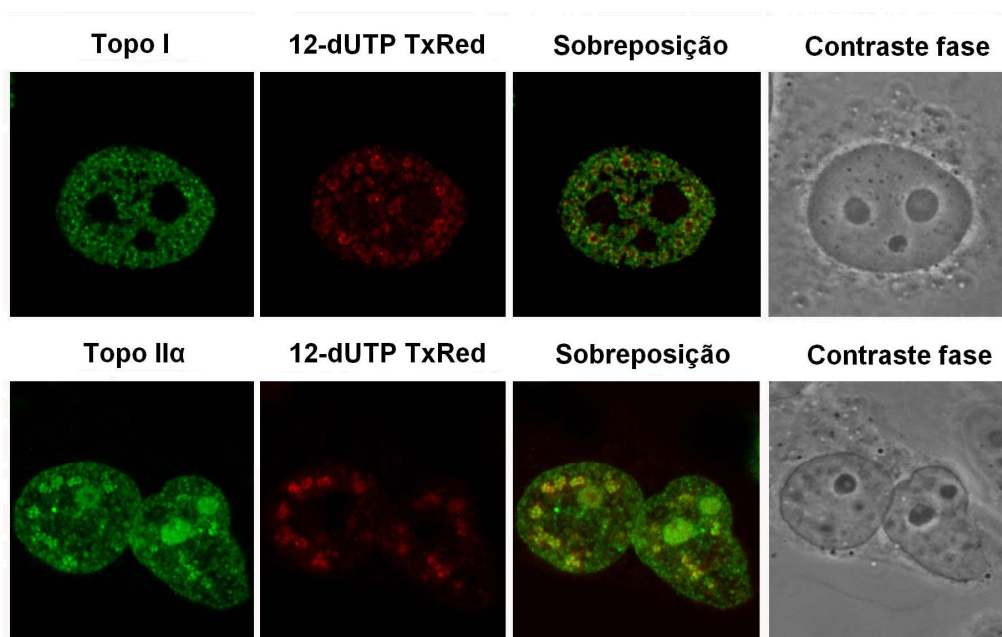


Figura 10 – As topoisomerases I e II α co-localizam parcialmente com os sítios de replicação do adenovírus. As acumulações de morfologia anelar da topoisomerase I (1ª linha, a verde) e da topoisomerase II α (2ª linha, a verde) sobrepõem-se, parcialmente, aos sítios da replicação viral detectados através da microinjecção intranuclear de um desoxi-nucleótido modificado (a vermelho).

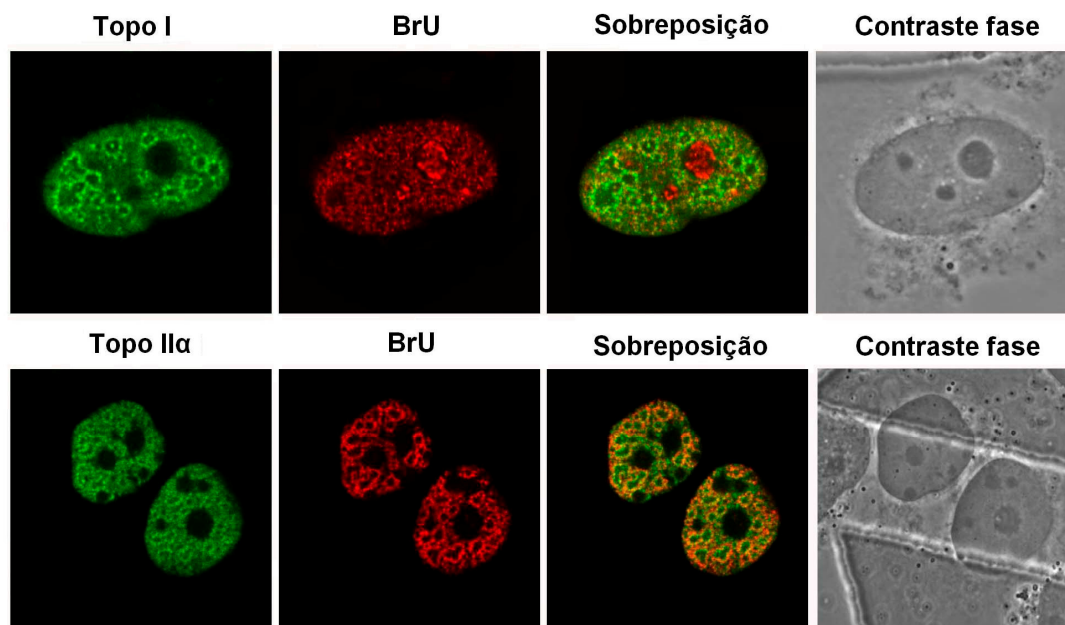


Figura 11 – As topoisomerases I e II α co-localizam parcialmente com os sítios de transcrição viral. As acumulações em anel das topoisomerases I (1ª linha, a verde) e II α (2ª linha, a verde) co-localizam com os locais de transcrição viral (a vermelho).

Porque nem sempre os locais de acumulação correspondem a locais de maior actividade biológica, usámos um ensaio citológico que permite discriminar a fracção activa de topoisomerases da sua fracção cataliticamente inerte. Este ensaio com resolução subcelular (*DRT assay - Differential Retention of Topoisomerase* (Agostinho *et al.*, 2004)) baseia-se no conhecimento de que os venenos específicos para a topoisomerase I e para as topoisomerases de tipo II retêm no ADN toda a fracção enzimática que entrou em actividade catalítica durante o tempo de exposição às drogas, tornando-a insolúvel. Os venenos usados foram a CPT (5 μ M, 15 minutos) e o ETOP (50 μ M, 15 minutos) que estabilizam os complexos de clivagem ADN-topoisomerase I e ADN-topoisomerase II, respectivamente. Após a pré-extracção das células com uma solução detergente de salinidade elevada, a fracção topoisomerásica insolúvel/cataliticamente activa é a que é predominantemente retida e imunodetectada (ver Capítulo II – Material e métodos, ponto II.3). A manutenção dos padrões de distribuição nos grupos tratados contrastou com a ausência quase total de topoisomerases nos grupos controlos (Fig. 12), revelando que as acumulações de topoisomerase (I e II) junto das fábricas virais são essencialmente formadas por populações cataliticamente activas.

Uma vez que as topoisomerases (tipos I e II) se concentram próximo das fábricas virais, investigámos se o recrutamento e a permanência das topoisomerases junto das fábricas dependia da replicação viral. A inibição da replicação viral por incubação celular com hidroxiureia (10 mM, 1 hora) e AraC (100 µg/ml, 1 hora) não alterou o padrão de distribuição das topoisomerases, diferindo das evidências obtidas em células de mamífero. Com efeito, Agostinho *et al.* (2004) observou que o recrutamento da topoisomerase II α para os sítios de replicação é dependente da replicação activa (i.e., sensível à hidroxiureia).

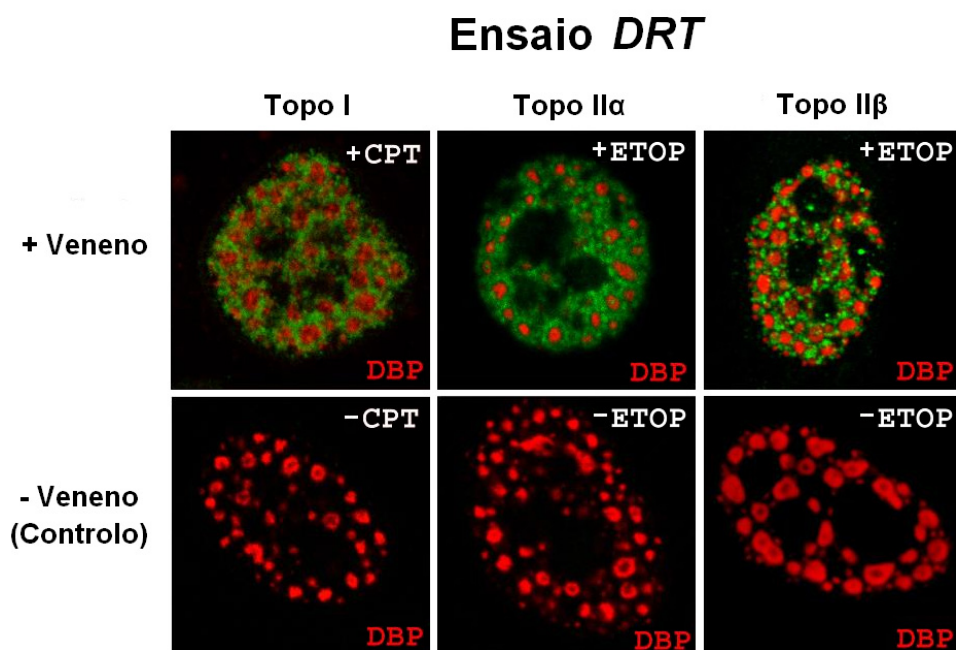


Figura 12 – As acumulações das topoisomerases I, II α e II β junto às fábricas virais são formadas por populações moleculares cataliticamente activas. Células HeLa infectadas foram incubadas com venenos anti-topoisomerase (1ª linha) ou com DMSO (2ª linha, grupo controlo), submetidas ao ensaio DRT e marcadas para DBP (a vermelho) e uma das três topoisomerases estudadas (a verde).

III.2. A mobilidade das topoisomerases I e II α é reduzida significativamente junto às fábricas adenovirais

Após a observação do padrão de distribuição das topoisomerases I, II α e II β por técnicas imunocitoquímicas, estudámos o perfil cinético das proteínas de fusão GFP-Topo I^{wt}, GFP-Topo I^{Y723F} (mutante pontual do centro catalítico) e GFP-Topo II α ^{wt}, por *FRAP*, de forma a corroborar os resultados obtidos sobre a sua actividade catalítica. Para a realização deste estudo quantitativo foram seleccionadas as células HeLa que mostrassem níveis baixos de expressão da proteína de fusão, com o objectivo de evitar os efeitos deletérios da sobre-expressão (McPherson & Goldenberg, 1998). Para cada experiência de *FRAP*, uma área intranuclear de forma circular e de tamanho predefinido ($\varnothing = 1,42 \mu\text{m}$) foi atravessada por um feixe de *laser* de elevada potência de modo a eliminar o sinal fluorescente emitido pelo *tag* GFP. A recuperação de fluorescência nos anéis junto das fábricas virais e no nucleoplasma de células não infectadas (controles), consequência do movimento das proteínas de fusão presentes no restante volume nuclear, foi gravada ao longo do tempo. O modelo matemático utilizado para a interpretação dos dados experimentais foi anteriormente publicado por Calapez *et al.* (2002) e Braga *et al.* (2004), e permitiu calcular o coeficiente de fusão (*D*) e a fracção imóvel (*IF*) da proteína fluorescente *in vivo*.

Os nossos resultados mostram que para as proteínas de fusão GFP-Topo I^{wt} e GFP-Topo II α ^{wt}, a recuperação da fluorescência junto às fábricas virais e no nucleoplasma é rápida e completa (50 segundos após o *bleach* induzido pelo pulso de *laser*), afastando um eventual papel estrutural destas enzimas na formação e manutenção das fábricas virais e sugerindo que não se difundem livremente no interior do núcleo (Fig. 13, A e C). Apesar de rápida e total, a recuperação da intensidade de fluorescência das proteínas de fusão GFP-Topo I^{wt} e GFP-Topo II α ^{wt} foi sempre mais demorada junto às fábricas virais do que no nucleoplasma, sugerindo o enriquecimento de subpopulações cataliticamente activas na formação dos anéis virais, uma vez que mostravam um maior tempo de residência nestes domínios. Para a GFP-Topo I^{wt}, o valor obtido para o coeficiente de difusão nos anéis foi de $0,057 \pm 0,009 \mu\text{m}^2/\text{s}$, enquanto que para o nucleoplasma foi de $0,176 \pm 0,031 \mu\text{m}^2/\text{s}$. A recuperação total da fluorescência foi observada 150 segundos após o pulso de *laser* atravessar o anel viral e após 50 segundos quando o fotobranqueamento ocorria no nucleoplasma. Estes resultados

indicam que a GFP-Topo I^{wt} apresenta uma velocidade de difusão três vezes superior no nucleoplasma do que nos anéis virais, sugerindo a concentração de populações com maiores tempos de residência e, possivelmente, por aumento da actividade catalítica.

Relativamente à proteína de fusão GFP-Topo II α ^{wt}, a recuperação total da fluorescência foi registada 100 segundos após o fotobranqueamento do anel viral e ao fim de 50 segundos quando o *bleach* era nucleoplasmático. O valor do coeficiente de difusão para a GFP-Topo II α ^{wt} no nucleoplasma foi aproximadamente o dobro do valor obtido nos anéis virais ($D_{\text{nucleoplasma}}$: $0,185 \pm 0,030 \mu\text{m}^2/\text{s}$; $D_{\text{anel viral}}$: $0,105 \pm 0,014 \mu\text{m}^2/\text{s}$). De salientar que os tempos de residência obtidos nos grupos de controlo para a GFP-Topo II α ^{wt} foram semelhantes aos tempos obtidos por Christensen *et al.* (2002), Christensen *et al.* (2003) e Mielke *et al.* (2004).

Para perceber se a diferença entre os coeficientes de difusão nucleoplasmáticos e anelares era devida a um incremento da actividade catalítica das topoisomerases sobre o ADN viral, realizámos experiências de *FRAP* em células expostas à CPT e ao ETOP, de forma a estabilizar covalentemente os complexos de clivagem topoisomerase I-ADN-Camptotecina ou topoisomerase II α -ADN-Etoposido, formados durante o curto período de incubação com o veneno (15 minutos). Os resultados obtidos a partir das experiências de *FRAP* nos anéis virais revelaram que ambas as topoisomerases apresentam mobilidade reduzida, e que, aproximadamente, metade das proteínas GFP-Topo I^{wt} e GFP-Topo II α ^{wt} que formam os anéis virais se torna imóvel após a curta incubação com o veneno específico (Fig. 13, A e C, curva verde). Desta forma, os nossos dados sugerem fortemente que os anéis virais representam locais intranucleares onde estas proteínas estão envolvidas activamente na catálise do ADN viral, validando as observações realizadas pelo *DRT assay*. Concomitantemente, junto das fábricas virais, o valor do coeficiente de difusão para a proteína mutada no centro catalítico (GFP-Topo I^{Y723F}) foi de $0,019 \pm 0,004 \mu\text{m}^2/\text{s}$, cerca de três vezes inferior ao da proteína de fusão GFP-Topo I^{wt}. Estes resultados parecem indicar que a actividade catalítica facilita a libertação da topoisomerase I dos locais de ligação à molécula de ADN, no final da reacção catalítica, como foi inicialmente proposto por Christensen *et al.* (2002a).

Por último, investigámos se as propriedades cinéticas e, consequentemente, a intensa actividade catalítica da GFP-Topo I^{wt} e da GFP-Topo II α ^{wt} verificada junto das fábricas virais, seriam dependentes dos fenómenos de replicação e de transcrição virais activos. Para este fim, células HeLa transfectadas selectivamente com as proteínas de

fusão anteriormente referidas e infectadas com adenovírus foram tratadas com um inibidor da transcrição (DRB, 75 μ M, 60 minutos) e/ou com um inibidor da replicação (hidroxiureia, 10 mM, 60 minutos). Tanto as concentrações das drogas, como os tempos de incubação foram testados de forma a inibirem totalmente a transcrição e/ou a replicação viral. As experiências de *FRAP* conduzidas nestas condições, mostraram que a mobilidade da GFP-Topo I^{wt} não é alterada significativamente após a inibição total da transcrição e da replicação viral. No entanto, a fracção imóvel e a mobilidade desta proteína foram reduzidas após a incubação com um veneno anti-topoisomerase I, mostrando que a topoisomerase I se mantém cataliticamente activa, após a inibição total dos fenómenos de transcrição e de replicação do adenovírus (IF=40% após inibição da transcrição viral e IF=30% nas experiências onde a transcrição e a replicação viral foram inibidas em simultâneo (Fig. 13 B, curvas traçadas a verde e a violeta). No que respeita à proteína de fusão GFP-Topo II α ^{wt}, a inibição da transcrição viral não deu origem a alterações expressivas da sua cinética ($D=0,145\pm0,03$ μ m²/s vs. $D=0,105\pm0,014$ μ m²/s grupo de controlo não tratado), não sendo possível detectar uma fracção imóvel (Fig. 13 D, curva azul). A inibição adicional da replicação viral reduziu, significativamente, o coeficiente de difusão da GFP-Topo II α ^{wt} nos anéis virais ($D=0,042\pm0,005$ μ m²/s), não mostrando fracção imóvel ao fim de 125 segundos de observação microscópica. Após exposição ao etoposido, a fracção móvel assume valores entre os 25% e os 30% consoante esteja a transcrição viral inibida ou a transcrição e a replicação cumulativamente inibidas.

Como controlos experimentais da técnica de *FRAP* foram utilizadas células HeLa vivas a expressar GFP que se difunde livremente no interior da célula e que, por essa razão, apresenta uma recuperação total de fluorescência num intervalo de tempo inferior a um segundo, e células HeLa fixadas que expressaram GFP-Topo I^{wt} que não mostra recuperação de fluorescência, servindo de controlo para proteínas imóveis (Fig. 14 A e B).

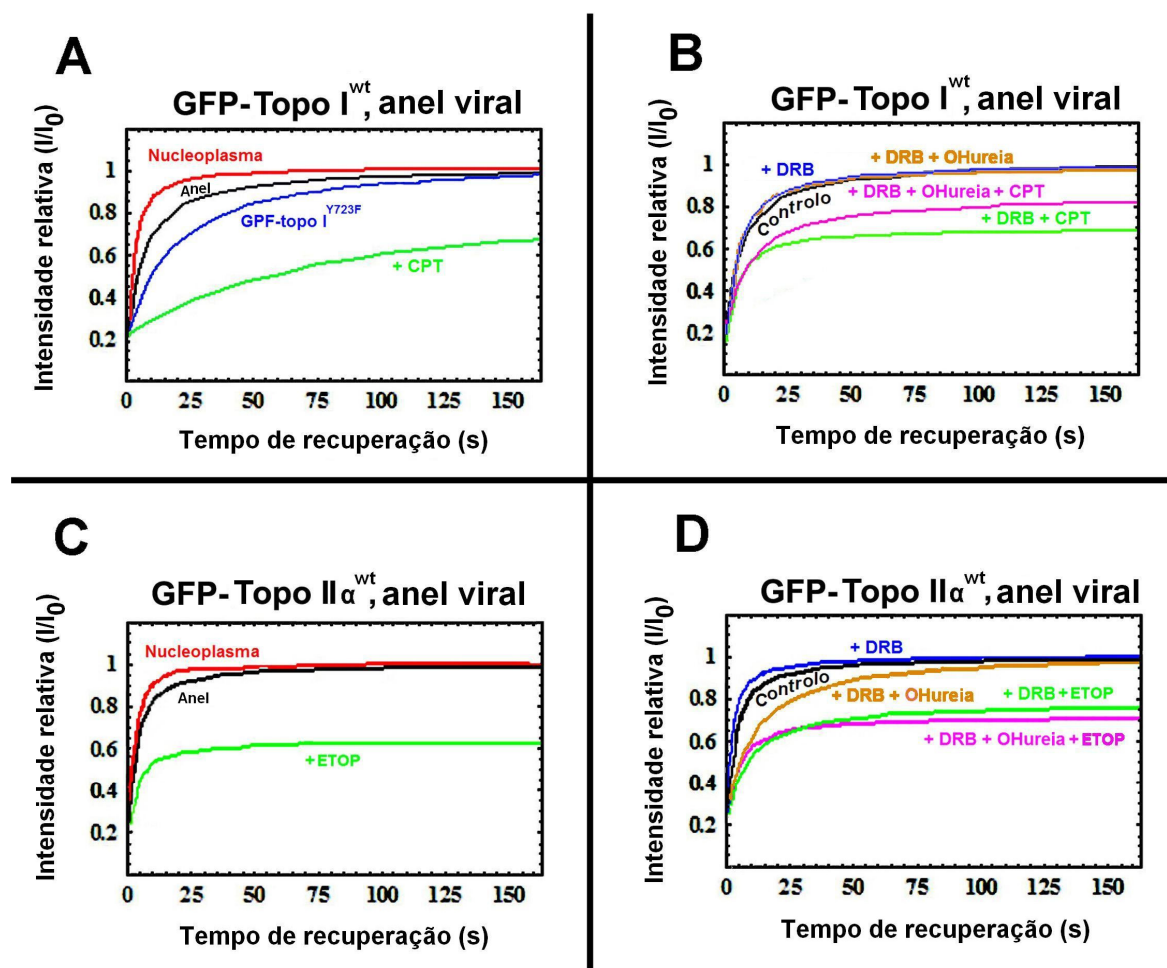


Figura 13 – Cinética das proteínas de fusão GFP-Topo I^{wt}, GFP-Topo I^{Y723F} e GFP-Topo IIα^{wt} em células HeLa infectadas pelo adenovírus e analisadas 16 horas após infecção. Cada curva de recuperação de fluorescência foi traçada a partir dos dados obtidos de 3 experiências independentes, num total de 15 células analisadas. **A)** Curvas de recuperação de fluorescência da proteína GFP-Topo I^{wt}, obtidas após o *bleach* de uma área circular: no nucleoplasma de células HeLa não infectadas (grupo controlo, curva traçada a vermelho); nos anéis virais, sem exposição prévia à CPT (curva traçada a preto); nos anéis virais, após a incubação com CPT por um período de 10 minutos (curva traçada a verde). A curva de recuperação de fluorescência do mutante catalítico (GFP-Topo I^{Y723F}) é mostrada a azul. **B)** Curvas de recuperação de fluorescência da proteína de fusão GFP-Topo I^{wt}, obtidas após o *bleach* de uma área circular nos anéis virais: sem incubação com o veneno CPT (curva traçada a preto); após a inibição total da transcrição viral, por incubação com DRB durante 60 minutos (curva traçada a azul); após o tratamento com DRB e de uma curta incubação com CPT (curva a verde); após a incubação com DRB e a inibição total da replicação viral com hidroxureia (curva traçada a amarelo); depois da incubação com DRB e hidroxureia, seguida de uma incubação curta com CPT (curva traçada a violeta). **C)** Curvas de recuperação da intensidade de fluorescência da proteína de fusão GFP-Topo IIα^{wt}, obtidas após o *bleach* de uma área circular no nucleoplasma de células HeLa não infectadas (grupo controlo, curva traçada a vermelho), nos anéis virais (curva traçada a preto) e nos anéis virais após uma incubação curta com ETOP (curva traçada a verde). **D)** Curvas de recuperação da GFP-Topo IIα^{wt} obtidas após o *bleach* de uma área

circular nos anéis (grupo controlo, curva traçada a preto), após a inibição da transcrição viral (curva traçada a azul), depois do tratamento com DRB e de uma curta incubação com ETOP (curva a verde), após a incubação com DRB e hidroxiureia (curva traçada a amarelo) e após a incubação das células com DRB e hidroxiureia, seguida de uma incubação curta com ETOP (curva traçada a violeta).

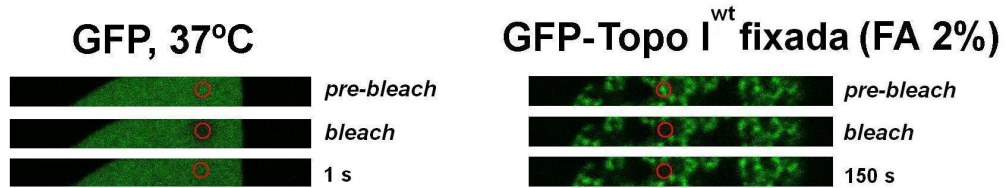
A**B**

Figura 14 – Imagens de FRAP e curvas de recuperação de fluorescência das duas proteínas de fusão usadas como controlo: a proteína GFP como proteína livre e a GFP-Topo I^{wt} como proteína imóvel após a sua fixação pelo formol. A) Imagens de uma célula HeLa viva a expressar proteína GFP (à esquerda) e de uma célula fixada a expressar GFP-Topo I^{wt}. As imagens mostradas foram capturadas antes, imediatamente depois, e após o tempo indicado, tendo como referência o pulso de *laser*. A área celular onde foi efectuada o *bleach* é delimitada por um círculo vermelho. **B)** Gráfico com as curvas de recuperação de fluorescência obtidas a partir de células HeLa que expressavam transientemente GFP ou GFP-Topo I^{wt}. Cada curva foi traçada a partir dos dados obtidos em 3 experiências independentes, num total de 15 células analisadas.

III.3. A actividade catalítica e o domínio N-terminal da topoisomerase I são essenciais para o recrutamento *in vivo*

De acordo com vários estudos bioquímicos (D'Arpa *et al.*, 1988 e Staker *et al.*, 2002) e estudos de cristalografia (Redinbo *et al.*, 1998), a topoisomerase I humana tem 765 resíduos (91 kDa), podendo ser dividida em quatro domínios: um domínio N-terminal (muito polarizado e pouco conservado; Met1-Gly214), um domínio central (muito conservado; Ile215-Ala635), um domínio *linker* (pequeno e pouco conservado, Pro636-Lys712) e um domínio C-terminal (muito conservado, Gln713-Phe765) que contém na posição 723 um resíduo de tirosina essencial para a actividade catalítica da proteína.

Relativamente ao domínio N-terminal, as funções biológicas que lhe são atribuídas passam pela regulação da localização intranuclear (Alsner *et al.*, 1992) e intranucleolar (Mo *et al.*, 2000) da proteína, promoção do relaxamento da hélice de ADN facilitando a sua clivagem posterior (Christensen *et al.*, 2003) e por promover interacções proteína-proteína com uma faixa alargada de parceiros moleculares como são exemplo: a nucleolina, várias proteínas da família SR, o PCNA, o p53, o antigénio T SV40 e a proteína de ligação à TATA *box*. Estruturalmente, estas interacções específicas são facilitadas pela conformação linear apresentada pelo domínio N-terminal (Haluska & Rubin, 1998). Uma vez que são estas interacções proteína-proteína que medeiam, frequentemente, o recrutamento enzimático *in vivo*, procurámos perceber se o domínio N-terminal desempenha um papel relevante no recrutamento da topoisomerase I para sítios de actividade catalítica. Paralelamente, estudámos se o resíduo de tirosina presente no centro catalítico desempenhava algum papel nesse recrutamento. Para tal, foram analisados por microscopia confocal os padrões de distribuição de várias proteínas de fusão mutadas no resíduo de tirosina presente no centro catalítico e no domínio N-terminal. As células seleccionadas para observação microscópica mostravam um nível baixo de expressão da proteína de fusão transfectada, tendo sido colhidas às 16 horas após a infecção viral.

Antes de iniciarmos as experiências *in vivo* verificámos, pela técnica de *Western blot*, o tamanho e o nível de expressão das várias proteínas mutantes usadas neste estudo, nomeadamente, a proteína de fusão *full length* (GFP-Topo I^{wt}), o mutante pontual no centro catalítico (GFP-Topo I^{Y723F}), as duas proteínas de fusão onde foi

removido parcial ou totalmente o domínio N-terminal (GFP-Topo I^{Δ1-138} e GFP-Topo I^{Δ1-210}) e duas proteínas de fusão truncadas a partir do resíduo 211 (GFP-Topo I^{1-210^{wt}} e GFP-Topo I^{1-210-3K^R}), apresentando-se a segunda proteína mutada nas três sequências de consenso para a SUMOilação por SUMO-1. Na pista 2 do *western blot* (Fig. 16) pode ser observada uma banda de 110 kDa com o tamanho esperado, obtida a partir dos extractos totais de células transfectadas com a construção GFP-Topo I^{wt}. Os extractos totais obtidos de células HeLa transfectadas selectivamente com as restantes proteínas de fusão mostram uma banda única, com o peso molecular esperado, evidenciando que não ocorreram rearranjos ou degradação no interior das células (Fig. 16, pistas 2, 4, 6, 8, 10 e 12) ou nas culturas infectadas com adenovírus (Fig. 16, pistas 3, 5, 7, 9, 11 e 13). De salientar que a intensidade de banda das proteínas transfectadas foi sempre inferior à intensidade da banda de topoisomerase I endógena (Fig. 16, pista 1) para volumes de *loading* semelhantes (detectados com um anticorpo anti-β-actina), validando as baixas intensidades de fluorescência das células transfectadas observadas por microscopia. Outro controlo experimental passou por verificar se a inserção do *tag* GFP na extremidade N-terminal da topoisomerase I alterava os padrões de distribuição desta proteína de fusão, comparando-os com os observados para a enzima endógena em células HeLa infectadas. De forma consistente com os resultados imunocitoquímicos obtidos anteriormente, o padrão de distribuição da GFP-Topo I^{wt} nas células HeLa, colhidas 16 horas após o início da infecção, mostrava acumulações da proteína fluorescente em redor dos focos de proteína viral DBP e uma depleção total dos *pools* nucleoplasmático e nucleolar (Fig. 17, 1ª linha), sugerindo que o *tag* GFP não altera o recrutamento e, consequentemente, a localização intranuclear da topoisomerase I.

De forma a analisarmos o papel do centro catalítico no recrutamento da topoisomerase I *in vivo*, mais concretamente do resíduo de tirosina na posição 723, substituímos este aminoácido aromático por outro (fenilalanina), obtendo um mutante pontual e inerte do ponto de vista catalítico – GFP-Topo I^{Y723F} (Fig. 15). A análise microscópica do padrão de distribuição desta proteína mutante revelou acumulações nucleoplasmáticas punctiformes, co-localizantes com a proteína viral DBP (Fig. 17, 2ª linha). Estas acumulações mostravam uma morfologia e localização muito diferentes das acumulações anelares, em redor das fábricas virais, observadas na proteína *wild type* (Fig. 17, 1ª linha). Adicionalmente, a manutenção do *pool* nucleoplasmático na proteína mutada e as maiores dimensões das fábricas virais, reforçam o argumento que para o

recrutamento correcto da Topoisomerase I é necessário um centro catalítico intacto, e eventualmente, actividade catalítica.

Atendendo às inúmeras funções do domínio N-terminal e, em especial, ao elevado número de interacções proteína-proteína que este domínio regula, questionámos se a subtracção deste domínio alterava o recrutamento da topoisomerase I *in vivo*. Assim, eliminámos a porção inicial ou a totalidade do domínio N-terminal a partir da construção GFP-Topo I^{wt}, resultando na construção de dois mutantes: GFP-Topo I^{Δ1-138} e GFP-Topo I^{Δ1-209} (Fig. 15). Enquanto que ao primeiro faltam dois NLS (sinais para importação/localização nuclear) não essenciais presentes nas regiões compreendidas entre os resíduos 59-65 e 117-146 (Mo *et al.*, 2000), ao segundo mutante foi acrescentado um NLS exógeno de forma a mimetizar a localização fisiológica da proteína (Fig. 15). Os padrões de localização para estas duas proteínas mutantes foram idênticos ao observado para a proteína GFP-Topo I^{Y723F}, isto é, acumulações difusas e co-localizantes com os focos de DBP, manutenção do *pool* nucleoplasmático e forte exclusão nucleolar (Fig. 17, 3ª e 4ª linhas). Estes resultados mostram que o domínio N-terminal e os seus 138 aminoácidos iniciais (e, consequentemente, o domínio N-terminal) são essenciais para um recrutamento correcto da topoisomerase I para junto dos locais de transcrição e de replicação viral. Como a remoção do domínio N-terminal é suficiente para alterar a localização da topoisomerase I na célula de mamífero (Alsner *et al.*, 1992) e na célula HeLa durante a infecção pelo adenovírus, investigámos se este domínio isolado seria suficiente para ser recrutado pelo adenovírus, e se este recrutamento é dependente da SUMO-conjugação por SUMO-1. Fisiologicamente, a conjugação com SUMO-1 estimula a actividade catalítica da topoisomerase I e promove a sua exportação nucleolar (Rallabhandi *et al.*, 2002). De forma a testarmos as duas hipóteses, transfectámos separadamente as duas construções truncadas no domínio N-terminal: uma sem mutações (GFP-Topo I^{1-210wt}) e outra com três mutações pontuais, uma por cada sequência consenso para o SUMO-1 (GFP-Topo I^{1-210-3K'R}) (Fig. 15). A proteína GFP-Topo I^{1-210wt} mostrou acumulações nucleoplasmáticas discretas que co-localizavam com os focos de proteína DBP e manutenção do *pool* nucleoplasmático e nucleolar (Fig. 18, 1ª linha). Estes resultados indicam que a localização intranuclear da proteína truncada no domínio N-terminal não mimetiza o padrão de distribuição observado na topoisomerase I *full length* e que apesar de se mostrar essencial ao recrutamento da topoisomerase I para os locais de catálise, não é suficiente. As células HeLa transfectadas com a construção GFP-Topo I^{1-210-3K'R} mostraram um padrão de

distribuição muito diferente do observado nas células transfectadas com GFP-Topo I^{1-210wt}.

A forte localização intranucleolar e as acumulações dispersas pelo nucleoplasma, por vezes, sem relação com a proteína DBP (Fig. 18, 2ª linha, setas brancas), encontram explicação na impossibilidade desta proteína de fusão ser SUMOilada pelo SUMO-1 (ver Discussão). Em virtude do número e do tamanho das acumulações não mostrarem relação com as fábricas virais, e uma vez que observámos acumulações de topoisomerase II α não SUMOilada nos *speckles* quando inibíamos a transcrição celular (Agostinho *et al.*, 2004), decidimos verificar se as acumulações desta proteína mutante co-localizavam com estes subdomínios nucleares. A observação por microscopia confocal permitiu visualizar uma forte co-localização entre aqueles focos nucleoplasmáticos da proteína mutante e a proteína SC35, um marcador clássico de *speckles* (Fig. 19, 1ª linha). Esta co-localização tornou-se ainda mais evidente após a inibição da transcrição celular, por incubação com DRB (Fig. 19, 2ª linha).

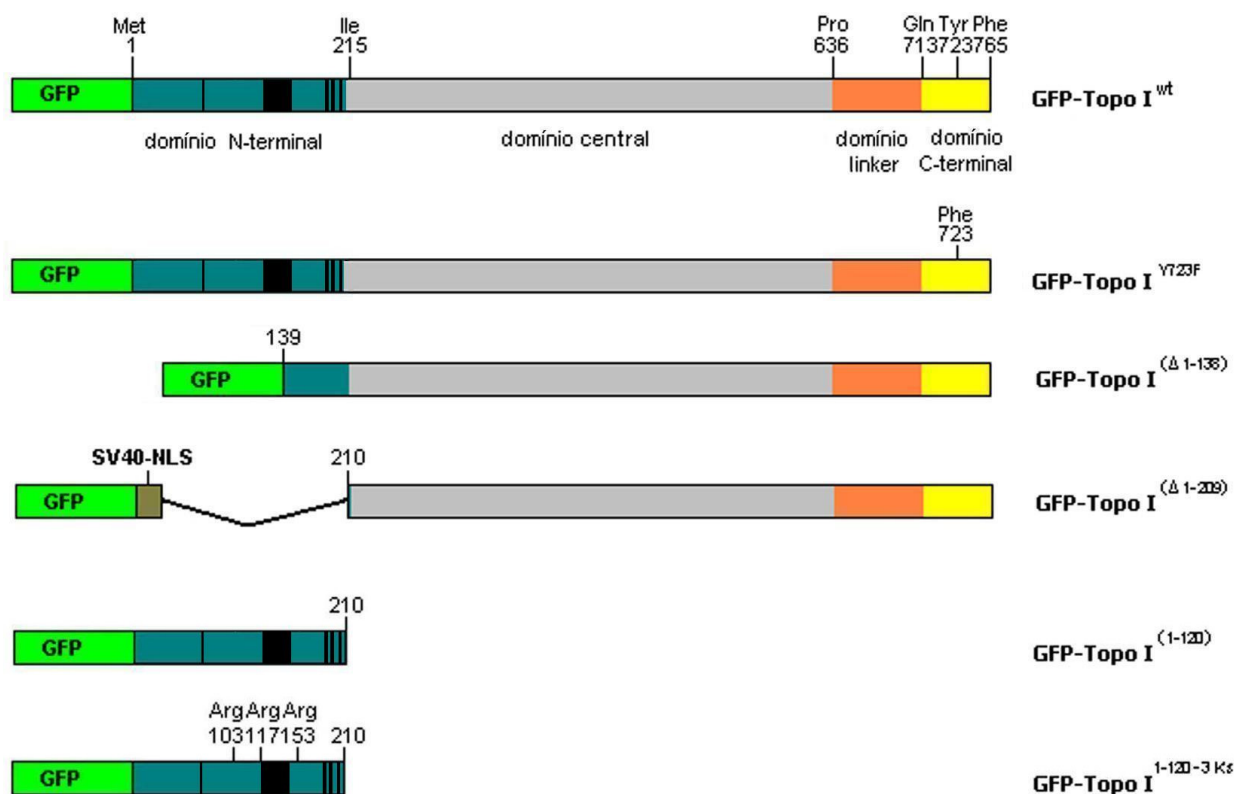


Figura 15 – Representação esquemática das proteínas de fusão usadas na análise mutacional da topoisomerase I. Para cada proteína são indicados os vários domínios presentes: *tag* GFP (a verde), N-terminal (a azul), central (a cinza), *linker* (a laranja) e C-terminal (a amarelo). As cinco NLS prováveis são indicadas a preto. A proteína representada no topo da figura corresponde à topoisomerase I *full length* fundida com um *tag* GFP, na extremidade N-terminal. A segunda proteína é um mutante pontual do centro catalítico, onde o resíduo de tirosina da posição 723 foi substituído por uma fenilalanina. A proteína de fusão GFP-Topo I^{Δ1-138} apresenta uma deleção do domínio N-terminal até ao resíduo 138, perdendo 2 NLS não essenciais. A proteína mutante GFP-Topo I^{Δ1-209} não apresenta o domínio N-terminal, que foi substituído por um NLS do SV40 (a cinza). A proteína GFP-Topo I¹⁻¹²⁰ representa uma proteína de fusão com o *tag* GFP e o domínio N-terminal da topoisomerase I. A proteína de fusão GFP-Topo I^{1-120-3K^R} codifica para o domínio N-terminal mutado pontualmente nas três sequências consenso de SUMOilação por SUMO-1 (as lisinas nas posições 103, 117 e 153 foram substituídas por argininas).

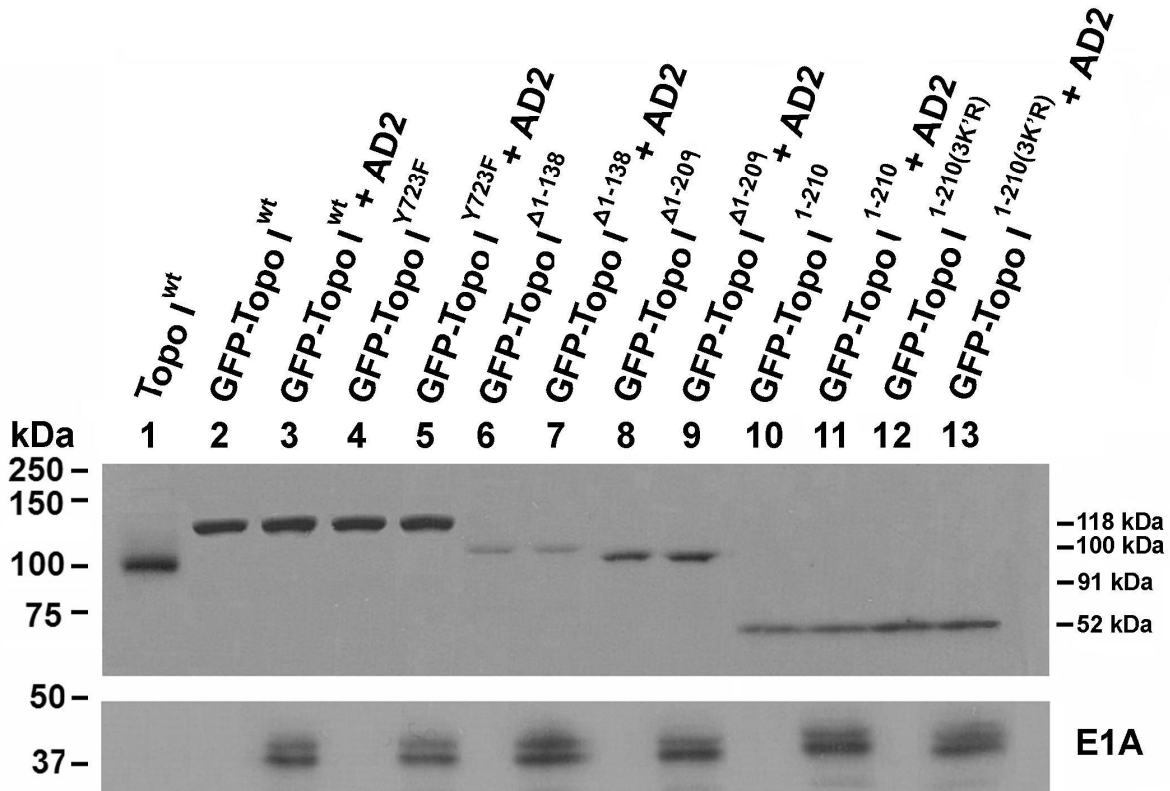


Figura 16 – Níveis de expressão das proteínas EGFP-Topo I detectados pela técnica de *Western Blot*. As construções transfectadas são indicadas no topo da figura. Uma mistura de anticorpos monoclonais anti-GFP foi usada na detecção das proteínas de fusão que mostraram, em todos os extractos, uma banda única, de tamanho esperado. Cada construção ocupa duas pistas consecutivas do gel; a primeira pista representa o nível de expressão da proteína transfectada numa cultura de células HeLa não infectada, e a segunda pista, o nível de expressão numa cultura de células HeLa às 16 horas pós-infecção; a presença da proteína adenoviral E1A identifica os extractos de células infectadas.

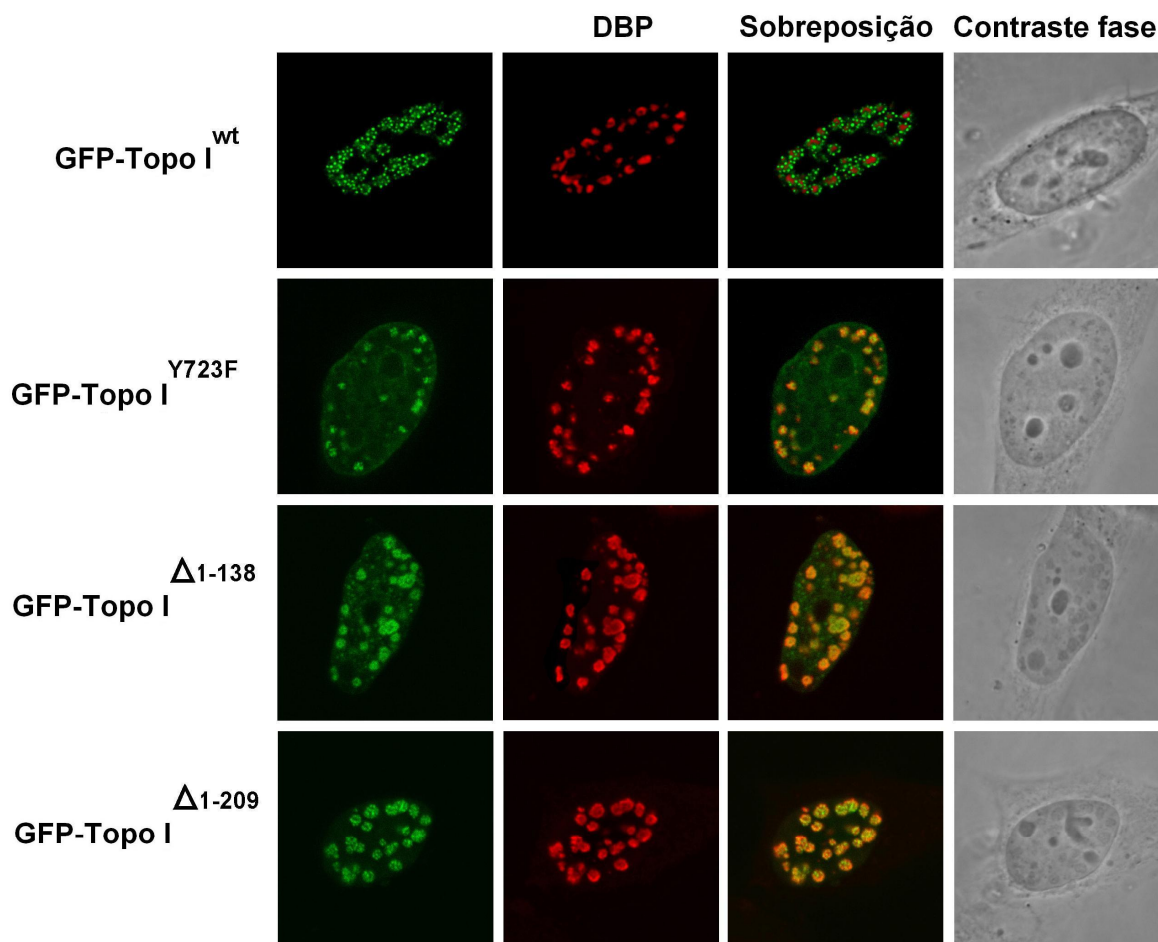


Figura 17 – Localização intranuclear das proteínas GFP-Topo I^{wt}, GFP-Topo I^{Y723F}, GFP-Topo I^{Δ1-138} e GFP-Topo I^{Δ1-209}, em células HeLa infectadas pelo adenovírus. As imagens capturadas resultam de células transfectadas dois dias antes da infecção pelo adenovírus e colhidas 16 horas após o início infecção viral. As acumulações intranucleares, em forma anelar, da proteína GFP-Topo I^{wt} circundam as acumulações da proteína viral DBP (1ª linha). As proteínas: GFP-Topo I^{Y723F}, GFP-Topo I^{Δ1-138} e GFP-Topo I^{Δ1-209} mostram um padrão de distribuição semelhante entre si, sendo possível observar uma boa co-localização entre estas proteínas de fusão e os focos da proteína viral DBP, ao mesmo tempo que o *pool* nucleoplasmático se mantém preservado.

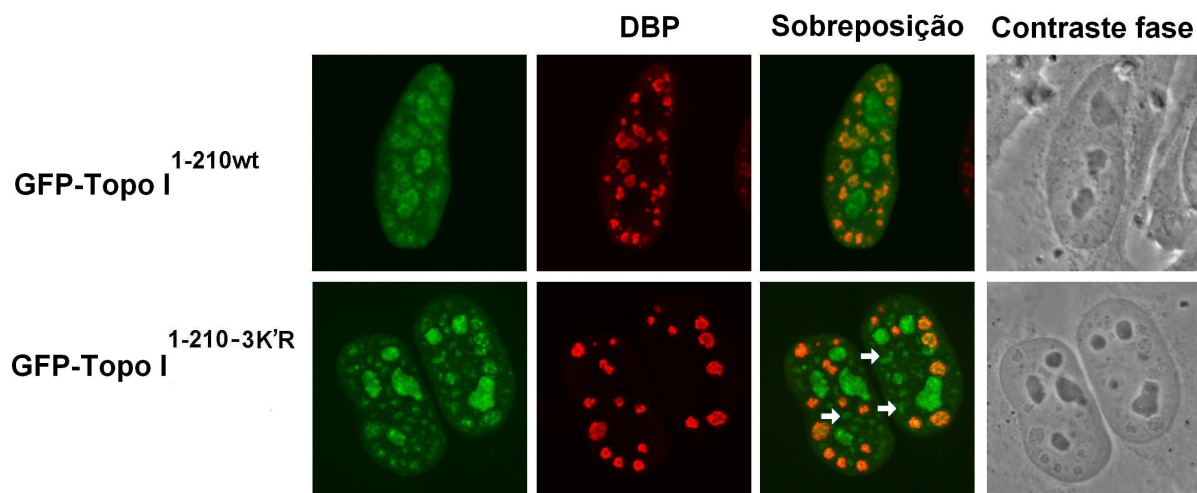


Figura 18 – Localização intranuclear das proteínas GFP-Topo I^{1-210wt} e GFP-Topo I^{1-210-3K'R} em células HeLa infectadas pelo adenovírus. Ambas as proteínas de fusão mostram um recrutamento fraco e difuso para os focos da proteína DBP, a manutenção do *pool* nucleoplasmático e um incremento da fracção nucleolar. Adicionalmente, a proteína GFP-Topo I^{1-210(3K'R)} acumula-se em pequenos agregados não relacionados com focos da proteína DBP (setas brancas).

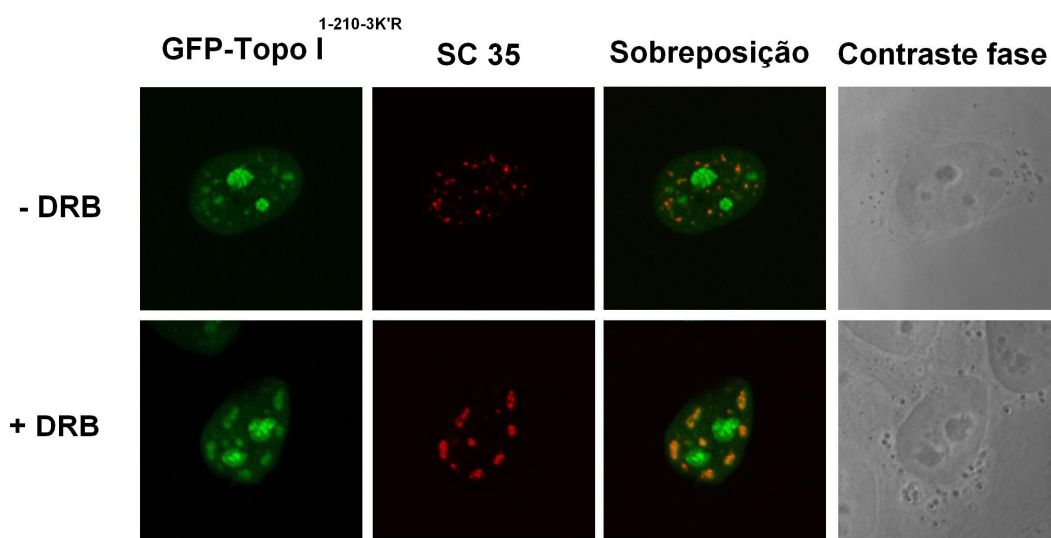


Figura 19 – Co-localização da proteína GFP-Topo I^{1-210-3K'R} com os *speckles* em células HeLa não infectadas. A proteína de fusão mostrou uma co-localização notável dos focos de acumulação nucleoplasmática com os *speckles*, particularmente visível após a inibição da transcrição pelo DRB (75 μ M, 30 min.). De salientar que a fracção nucleolar aumentou após a incubação com o DRB.

III.4. As concentrações proteicas e as actividades catalíticas das topoisomerases I, II α e II β mantêm-se constantes durante a fase tardia da infecção

Nas células de mamífero, as concentrações e as actividades catalíticas das topoisomerases variam ao longo do ciclo celular. Embora a topoisomerase I mostre uma expressão proteica constante, a sua actividade de relaxamento é máxima durante S e G2, fases em que o *stress* torsional do ADN é mais elevado. Por seu turno, a topoisomerase II α mostra concentrações e actividades catalíticas crescentes após a replicação do ADN, de forma a resolverem o elevado número de catenanos, antes da célula entrar em mitose. Apesar de serem bem conhecidas as variações da expressão génica e da actividade catalítica das topoisomerases I, II α e II β durante o ciclo celular, o seu comportamento na célula infectada pelo adenovírus permanece uma incógnita.

No modelo do adenovírus existem pelo menos três argumentos que apoiam o aumento da concentração celular e/ou da actividade catalítica destas enzimas. Se, por um lado, está descrita a sobreexpressão de inúmeras proteínas celulares durante a infecção viral, por outro, os nossos resultados imunocitoquímicos com técnicas de imunocitoquímica e ensaio *DRT* apontam para que o adenovírus esgote as topoisomerase I, II α e II β disponíveis na célula. Adicionalmente, o facto do adenovírus originar inúmeros problemas topológicos por replicar e a transcrever o seu genoma milhões de vezes deverá precipitar a necessidade acrescida de topoisomerases. Segundo Chow & Pearson (1985), a topoisomerase I vê a sua concentração aumentar dez vezes às 16 horas após a infecção, enquanto Schaack *et al.* (1990b) mostrou que a frequência de clivagem do genoma viral pela topoisomerase I é superior à frequência de clivagem pelas topoisomerases de tipo II que atingem uma actividade máxima às 12 horas após a infecção. Devido às fragilidades que estas evidências apresentam (ver Capítulo I – ponto I.3.4.), decidimos verificar se as concentrações das topoisomerases I, II α e II β variam ao longo da fase tardia da infecção. Após o *immunoblotting* com os anticorpos específicos, a intensidade de banda das três topoisomerases foi semelhante no extracto total não infectado (Fig. 20 A, pista 1) e nos extractos totais infectados, colhidos ao longo da infecção (Fig. 20 A; pista 2: 8h p.i., pista 3: 12h p.i., pista 4: 16h p.i., pista 5: 20h e pista 6: 30h p.i.). Como esperado, foi observada uma intensidade crescente da proteína viral E1A nos extractos de células infectadas, uma vez que esta proteína é

expressa ao longo da infecção. Estes resultados apesar de mostrarem que as concentrações das topoisomerasas celulares não variam durante a fase tardia da infecção contrapõem, parcialmente, as observações feitas por Chow e Pearson (1985). Porque, segundo estes investigadores, a quantidade de transcritos da topoisomerase I aumenta cerca de dez vezes nas células infectadas e porque nós observámos que a intensidade de banda se mantinha constante após a infecção, colocámos a hipótese do adenovírus aumentar a síntese proteica da topoisomerase I e, concomitantemente, acelerar a sua degradação pelo proteossoma. Com o propósito de elucidar esta questão foi analisada a intensidade de banda da topoisomerase I em extractos totais de células HeLa infectadas e incubadas, em separado, com DMSO (solvente; grupo controlo), emetina (um inibidor de síntese proteica; 20 µg/ml, 3,5 horas) e MG-132 (um inibidor do proteossoma; 50 µM, 3,5 horas) (Fig. 20 B, pistas 4-6). A intensidade de banda da topoisomerase I nos extractos totais obtidos a partir de células não infectadas e submetidas aos mesmos tratamentos (Fig. 20 B, pistas 1-3), e a variação na proteína viral E1A nos extractos infectados foram usados como controlos. Após *immunoblotting* foi possível observar que a intensidade de banda da topoisomerase I é semelhante no extracto infectado não tratado (Fig. 20 B, pista 4) e nos extractos infectados e tratados com emetina ou MG-132 (Fig. 20 B, pistas 5 e 6). Como esperado, a proteína E1A (controlo interno) mostrou menor concentração nas células tratadas com emetina e maior concentração nas células expostas ao MG-132, comparativamente, às células não inibidas. Resultados semelhantes foram obtidos para a topoisomerase I nos extractos totais de células não infectadas (Fig. 20 B, pistas 1-3). Estes resultados indicam que a concentração de topoisomerasas I, II α e II β junto das fábricas virais não reflecte um aumento da quantidade global destas enzimas, mas antes a sua redistribuição intracelular induzida pelo vírus.

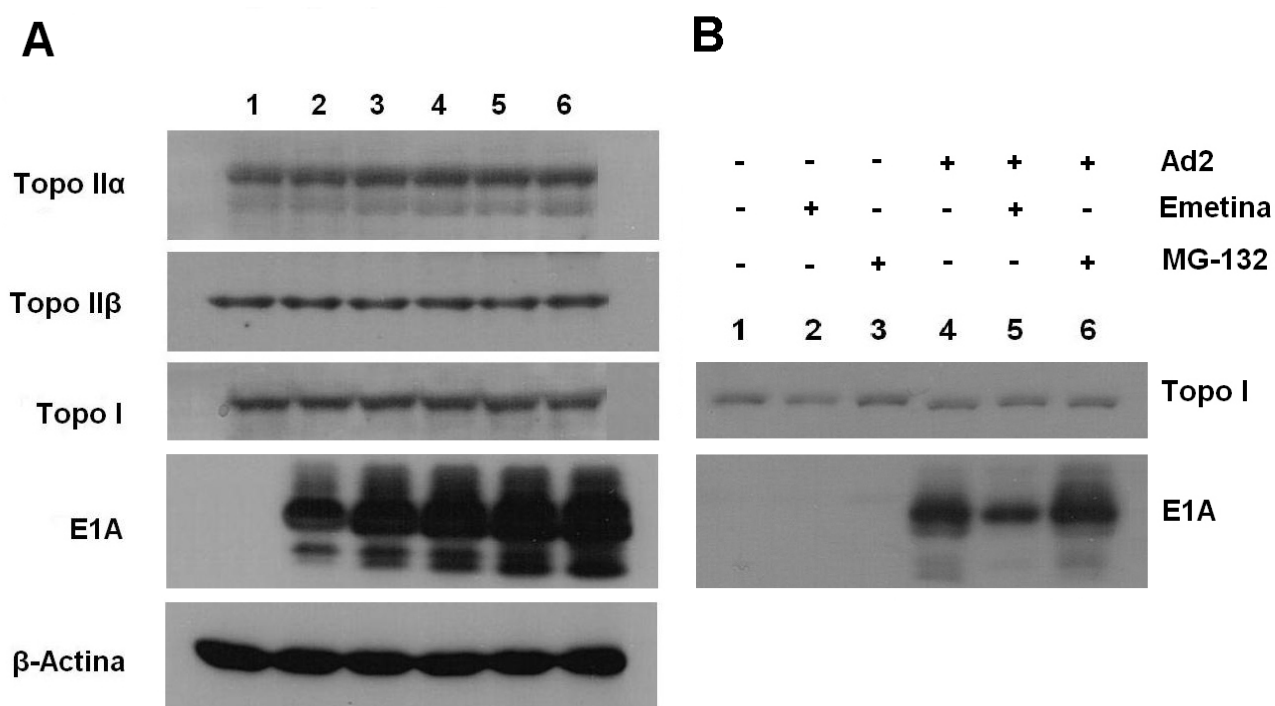


Figura 20 – As concentrações proteicas das topoisomerases I, IIα e IIβ não variam durante a infecção adenoviral. **A)** Detecção dos níveis proteicos das topoisomerases I, IIα e IIβ, da E1A e da β-actina em extractos celulares totais, por *Western blot*. Na pista 1 foi corrido o extracto total não infectado e nas pistas 2-6 extractos celulares colhidos em diferentes tempos de infecção (pista 2: 8h p.i.; pista 3: 12h p.i.; pista 4: 16h p.i.; pista 5: 20h p.i. e pista 6: 30h p.i.). A intensidade de banda das três topoisomerases é semelhante entre os extractos não infectado e os extractos infectados, ao contrário da proteína viral E1A que aumenta a sua concentração à medida que a infecção avança. O controlo de carga foi feito com a β-actina. **B)** Durante a replicação do adenovírus, a tradução da topoisomerase I e a sua degradação via ubiquina-proteossoma são inibidas. Nos extractos totais obtidos a partir de células HeLa infectadas e incubadas com DMSO (pista 4), com emetina (pista 5) e com MG-132 (pista 6), a intensidade de banda da topoisomerase I não é alterada. Esta observação não é válida para a proteína E1A que vê a sua concentração reduzir-se quando as células são incubadas com emetina e a sua concentração aumentar após incubação com MG-132, à semelhança da topoisomerase I nos extractos não infectados (pistas 1-3).

Apesar do adenovírus não induzir modificações nas concentrações celulares das topoisomerases I, IIα e IIβ durante a fase tardia da infecção, a hipótese de alterar as actividades catalíticas destas enzimas, de forma a assistirem à replicação e à transcrição viral crescentes, parece fazer algum sentido. Com o propósito de testarmos esta

hipótese, comparámos as actividades catalíticas da topoisomerase I e das topoisomerasas de tipo II presentes em extractos nucleares não infectados e em extractos nucleares infectados (16 horas p.i), sem recorrermos ao uso de venenos citotóxicos. Após a incubação de diluições seriadas dos extractos nucleares (factor de diluição 1:2) com uma quantidade pré-definida de ADN super-enrolado do plasmídeo pBR 322 (0,25 µg) ou com ADN catenado de cinetoplasto (*kDNA*) (0,21 µg), a actividade catalítica da topoisomerase I é proporcional ao aparecimento de forma relaxadas do ADN plasmídico (topoisómeros – Fig. 21 A, pista 9) e ao desaparecimento do ADN super-enrolado (Fig. 21 A, pista 8), enquanto a actividade catalítica das topoisomerasas de tipo II é detectada pela formação de 2 produtos de decatenação, o *kDNA* circular fechado e super-enrolado (Fig. 21 B, pista 8, banda de tamanho menor) e o *kDNA* circular aberto (Fig. 21 B, linha 9).

Após a corrida electroforética em gel de agarose dos produtos de reacção presentes nas diluições seriadas, concluímos que as actividades catalíticas das topoisomerasas não mostram diferenças significativas entre os extractos não infectados (Fig. 21 A e B, pistas 1-7) e nos extractos infectados (Fig. 21 A e B, pistas 10-16). Se, por um lado, a actividade de relaxamento da topoisomerase I a partir da 5ª diluição é insuficiente para relaxar a totalidade do ADN plasmídico (Fig. 21 A; extractos não infectados: pista 6 e extractos infectados: pista 15), por outro lado, a partir da 4ª diluição deixámos de observar ADN de cinetoplasto super-enrolado em ambos os extractos (Fig. 21 B; extractos não infectados: pista 5 e extractos infectados: pista 14). No seu conjunto, os resultados descritos acima indicam que a presença de milhões de genomas e de transcritos virais no interior da célula hospedeira não induz a sobreexpressão proteica das topoisomerasas I, II α e II β , ou o aumento das suas actividades catalíticas.

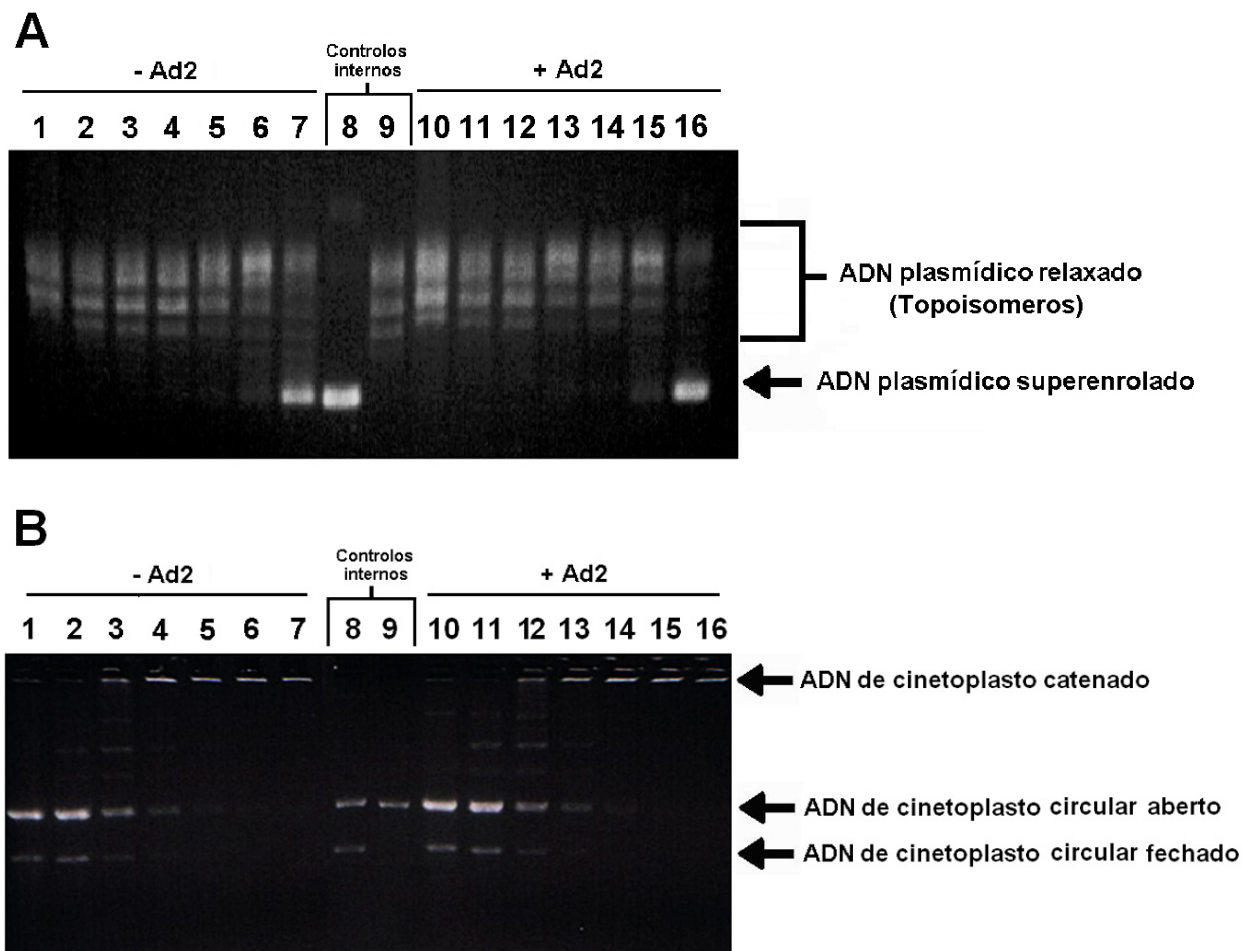


Figura 21 – As actividades globais da topoisomerase I e das topoisomerases de tipo II não são alteradas pela infecção adenoviral. A) A actividade de relaxamento da topoisomerase I foi titulada através da incubação de diluições seriadas dos extractos nucleares (factor de diluição 1:2) com 0,25 µg de ADN plasmídico super-enrolado. Diluições de extractos nucleares não infectados (pistas 1-7) e de extractos nucleares infectados (pistas 10-16) foram corridas em paralelo. A actividade da topoisomerase I foi identificada pela conversão do ADN super-enrolado (pista 8, controlo interno) em formas relaxadas - topoisómeros (pista 9, controlo interno). A actividade catalítica da topoisomerase I presente até à 4ª diluição seriada foi suficiente para relaxar todo o ADN de plasmídeo. **B)** Diluições seriadas de extractos nucleares não infectados (pistas 1-7) e de extractos infectados (pistas 10-16) foram incubados com 0,21 µg de ADN catenado de cinetoplasto. As pistas 8 e 9 mostram os produtos da decatenação esperados (controlos internos). A actividade de decatenação das topoisomerases de tipo II sob o ADN de cinetoplasto, a partir da 4ª diluição seriada é residual.

III.5. A depleção selectiva das topoisomerases I, II α e II β diminui a replicação do adenovírus

Até à data do início dos nossos trabalhos, apenas em três estudos realizados *in vitro* foi avaliado o papel das topoisomerases na replicação do adenovírus (Nagata *et al.*, 1983; Schaack *et al.*, 1990b e Wong & Hsu, 1990). Continuava desconhecida a contribuição relativa de cada topoisomerase celular naquele fenómeno. De forma a respondermos a esta questão e a serem evitados os efeitos deletérios causados pelo uso das drogas específicas (quebras duplas de DNA, *DNA double stand breaks* – *DSBs*), usámos a técnica de interferência de RNA (*RNA interference* – *RNAi*). Esta ferramenta molecular permite reduzir a expressão de um gene-alvo ao induzir a degradação prematura do seu RNA mensageiro específico. Ao reduzirmos, selectivamente, os níveis celulares da topoisomerase I, II α e II β , por transfecção com pequenos dupletos de RNA de sequência complementar (*small interferenceRNAs* – *siRNAs*), pudemos analisar o papel de cada proteína na replicação dos genomas virais.

A eficiência de depleção foi quantificada através da técnica de *Western blot*. Os níveis de topoisomerases I, II α e II β foram reduzidos a aproximadamente 25% dos seus níveis de expressão iniciais (Fig. 22). A redução dos níveis proteicos foi também avaliada pela análise morfológica das culturas celulares e por estudos imunocitoquímicos. Antes de iniciarmos as experiências com células infectadas, confirmámos a especificidade dos vários dupletos de *siRNA* usados (específicos e de controlo – *scrambled sequences*). A observação microscópica de células HeLa depletadas e colhidas 16 horas após o início da infecção, mostrou um atraso significativo na progressão da infecção viral. Por microscopia de contraste de fase, a identificação das fábricas virais nos núcleos revelou-se difícil, contrastando com a morfologia granitada dos núcleos controlo (Fig. 23, 1ª linha, Contraste fase, setas vermelhas). Por avaliação imunocitoquímica, o atraso na progressão da infecção traduziu-se na diminuição do número e do tamanho das fábricas virais, em particular nas células depletadas de topoisomerases tipo II (Fig. 23, 3ª e 4ª linhas). De forma a aferir a contribuição de cada topoisomerase celular na replicação adenoviral, através da quantificação do ADN viral presente nas células depletadas de topoisomerase I, II α ou II β às 16 horas pós-infecção, usámos a técnica de electroforese de campo pulsado (*pulse field gel electrophoresis* – PFEG). Ao quarto dia de interferência, as células HeLa foram

infectadas com um número semelhante de partículas virais e colhidas às 10 e às 16 horas pós-infecção, antes de se proceder à resolução electroforética dos dois ADNs, o celular e o viral. O ADN viral em todos os grupos infectados surge sob forma de uma banda única com 36 Kbp (Fig. 24, pistas 3-10). Os resultados obtidos revelam que a banda de ADN viral exibiu sempre maior intensidade nos grupos de controlo positivo do que nos grupos onde ocorreu a depleção efectiva de uma topoisomerase celular (Fig. 24, 10h p.i.: pistas 3-6; 16h p.i.: pistas 7-10). Adicionalmente, foi possível observar um *background* de fraca intensidade, muito semelhante em todos os grupos experimentais, sugerindo que as células *knocked down* não acumulam genomas virais incompletos induzidos por uma paragem prematura da replicação viral (Fig. 24, pistas 3-10). A quantificação da intensidade da banda relativa ao ADN viral nos vários grupos experimentais foi realizada no *scanner* multimodal Typhoon, e os resultados obtidos de três experiências independentes são apresentados na Fig. 25. A quantidade de ADN viral obtido nos controlos positivos (barras azuis) foi cerca do dobro do ADN viral presente nas células *knockdown* para a topoisomerase I (barras violetas). Nas células depletadas de topoisomerase II α (barras amarelas), a quantidade de genomas virais é cerca de um quarto do número de genomas virais presentes no grupo controlo, às 16 horas após a infecção. Esta diferença acentuou-se nas células depletadas de topoisomerase II β (barras castanhas), onde a média da intensidade de banda obtida foi de aproximadamente um décimo da intensidade de banda do grupo de controlo positivo.

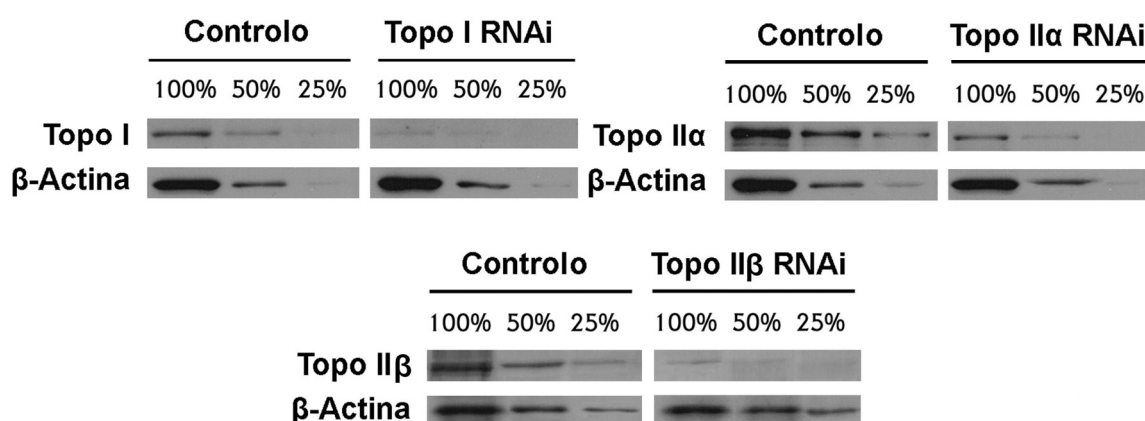


Figura 22 – Controlo da eficiência de depleção da topoisomerase I, II α e II β em células HeLa pela técnica de *Western blot*. Os níveis proteicos das três enzimas foram reduzidos a aproximadamente 25% para os estudos imunocitoquímicos e para quantificação de ADN por PFGE. Os controlos de carga que são mostrados resultam da incubação das membranas de nitrocelulose com um anticorpo primário anti- β -actina.

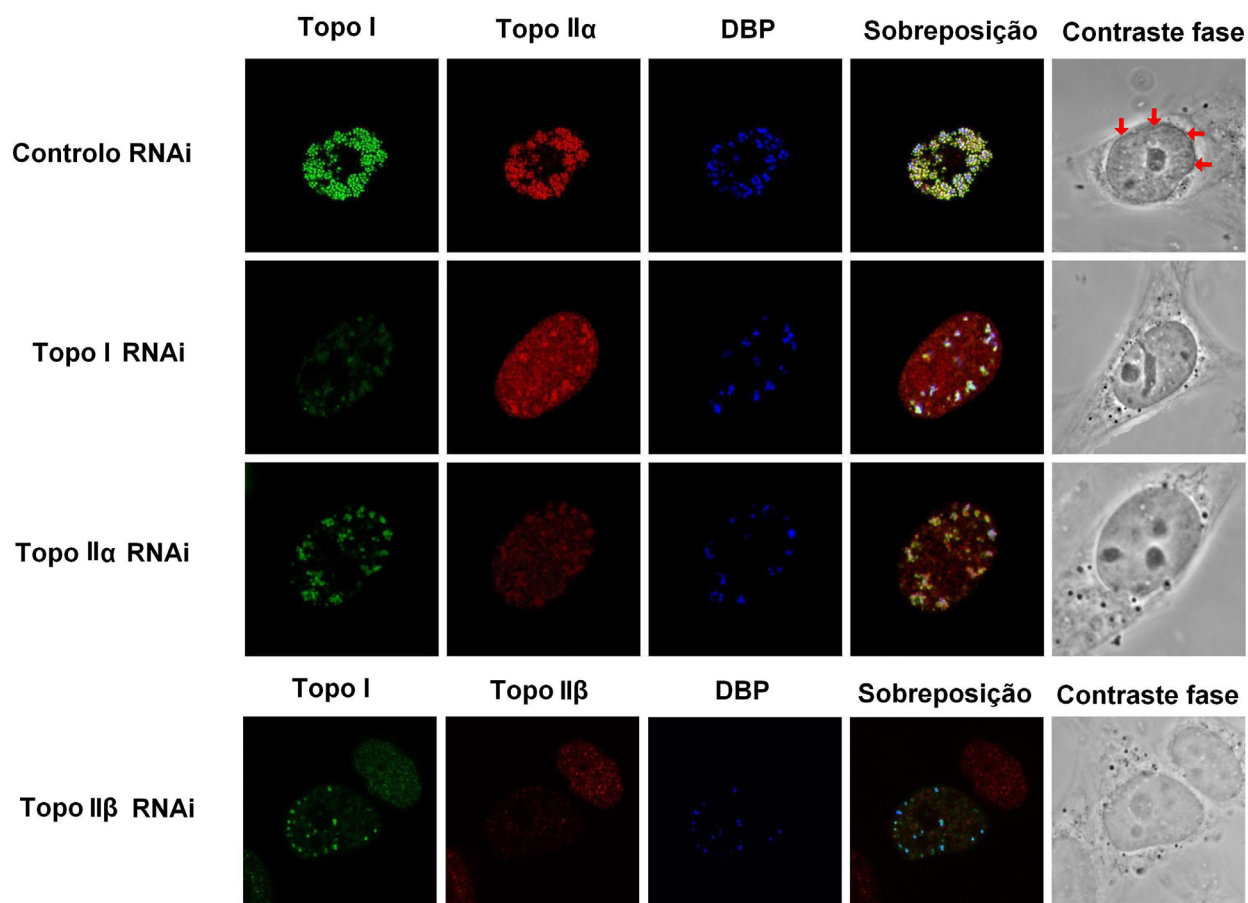


Figura 23 – A depleção isolada de topoisomerase I, II α e II β reduz o número e o tamanho das fábricas virais. A proteína DBP (a azul) foi usada como marcador de fábricas virais. Todas as imagens foram obtidas de populações celulares após o quarto dia de transfecção com *siRNAs* específicos para topoisomerase I, topoisomerase II α e topoisomerase II β (2^a, 3^a e 4^a linhas, respectivamente). Uma célula controlo transfectada com RNAi *scrambled* é mostrada na 1^a linha, onde algumas fábricas virais são identificadas com setas vermelhas.

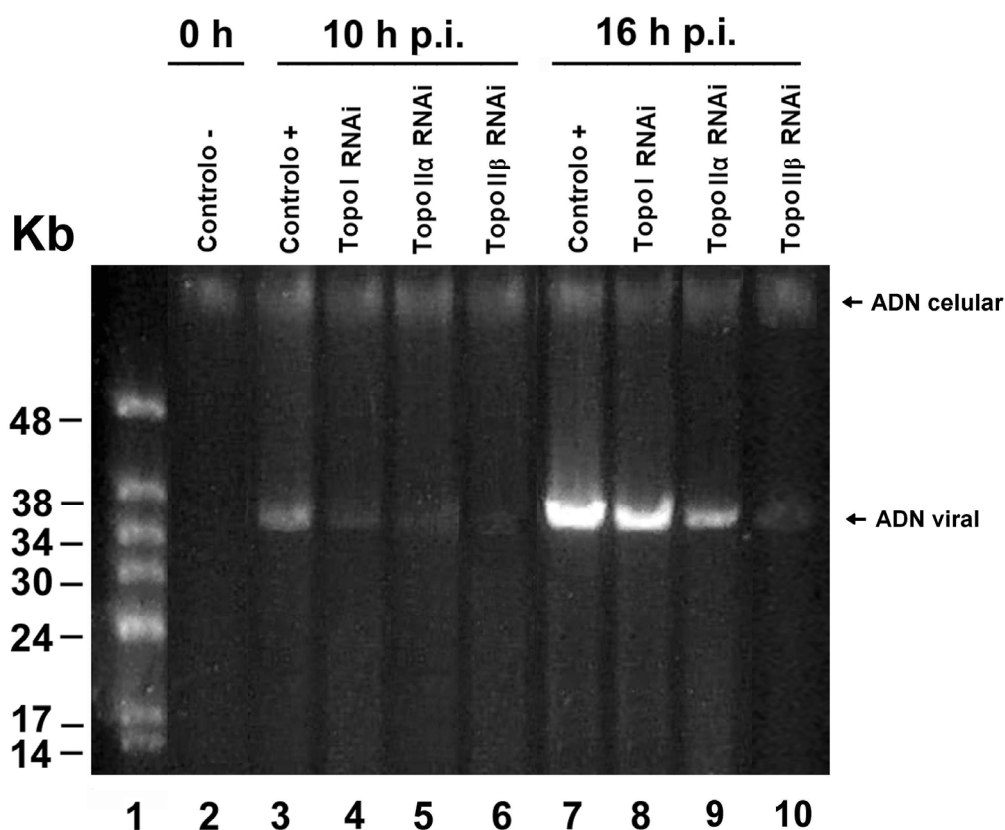


Figura 24 – A depleção selectiva das topoisomerasas celulares, em particular da topoisomerase II β , reduz o número de genomas virais replicantes. Imagem de um gel obtido pela técnica de PFGE; após a corrida electroforética, o gel de agarose foi corado com brometo de etídio e a intensidade de banda do ADN viral foi quantificada pelo *scanner* Typhoon. Enquanto a pista 1 mostra o marcador molecular (*Lambda DNA Mono Cut Mix*; New England Biolabs, MA, USA), a pista 2 representa o controlo negativo (células HeLa não infectadas). As pistas 3-6 correspondem a populações celulares colhidas 10 horas após o início da infecção e as pistas 7-10 a populações colhidas 16 horas após a infecção viral.

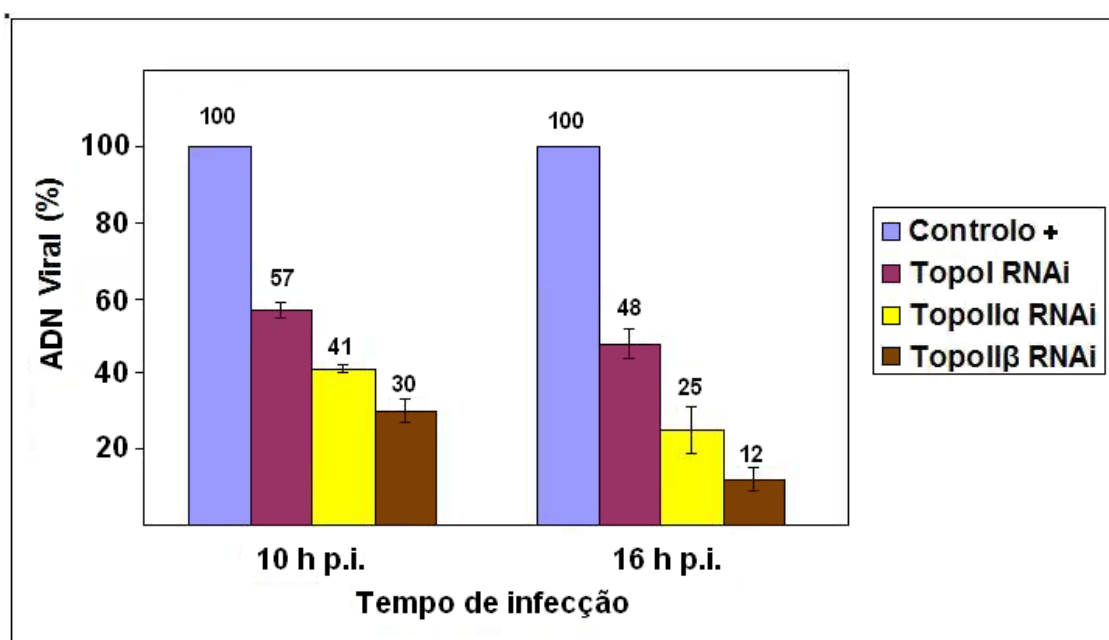


Figura 25 – Quantidades relativas de ADN viral presente às 10 horas e às 16 horas após a infecção. O ADN viral foi quantificado em células HeLa transfectadas com *siRNA* controlo (barras azuis) e *siRNA* específicos para topoisomerase I (barras magenta), para topoisomerase II α (barras amarelas) e para topoisomerase II β (barras castanhas). Cada barra representa a média das intensidades de banda obtida a partir de três experiências independentes e as barras de erro indicam intervalos de confiança de 95%.

CAPÍTULO IV

Discussão e conclusões

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nos últimos anos, várias descobertas excitantes têm mudado, significativamente, a forma de como vemos o núcleo celular. Os conhecimentos actuais permitem classificá-lo como um organelo estruturalmente complexo, de plasticidade elevada, onde as topoisomerases participam activamente na organização topológica do genoma. Com o intuito de aprofundarmos o conhecimento sobre o papel destas enzimas na replicação, estudámos a sua localização, dinâmica e função em células infectadas pelo adenovírus. Embora estudos antigos tenham demonstrado a importância da actividade topoisomérica (topoisomerase I) na replicação do genoma de adenovirus *in vitro* (Nagata *et al.*, 1983), e de estudos subsequentes sugerirem um papel para as topoisomerases de tipo II na replicação *in vivo* (Schaack *et al.*, 1990b), todos os resultados foram obtidos com recurso a fármacos inibidores de topoisomerases (“venenos”/*poisons*), que têm múltiplas acções acessórias. Por este motivo, o papel relativo das diferentes topoisomerases celulares na replicação deste vírus, de grande interesse em patologia humana e animal e na viroterapia do cancro, tem permanecido por esclarecer.

No presente trabalho foram usadas abordagens em que as actividades topoisoméricas foram analisadas no contexto da célula intacta e infectada, com utilização de tecnologias modernas que permitem análises *in vivo* (FRAP), em que o recurso a fármacos é restrito (administração aguda) e complementado por técnicas de manipulação genética selectiva para cada uma das topoisomerases humanas (depleção por siRNA). Neste capítulo discutimos os resultados obtidos e apresentamos as principais conclusões de uma forma integrada, com o objectivo de dar visão mais clara da relevância dos resultados.

IV.1. A replicação do adenovírus conduz a uma redistribuição intranuclear das topoisomerases I, II α e II β

Os nossos estudos imunocitoquímicos começaram por mostrar que as topoisomerases I, II α e II β não sofrem redistribuição nuclear durante a fase precoce da infecção, apesar da intensa actividade transcricional das unidades E1A, E1B e E4 que

ocorre neste período (Akusjarvi, 1993). Contudo, após a replicação dos genomas virais ter início, as topoisomerases são recrutadas para subdomínios nucleares discretos. Com o avançar da infecção, as acumulações punctiformes das topoisomerases I, II α e II β são substituídas por acumulações anelares que co-localizam entre si (Figuras 8 e 9) e os sítios de replicação e de transcrição virais (Figuras 10 e 11). O recrutamento total das populações topoisoméricas para junto das fábricas virais observado após a transição entre os dois padrões, deverá ser o resultado do número crescente de genomas virais no interior do núcleo. No final da fase tardia, o padrão anelar é substituído, progressivamente, por acumulações granulares intercromatínicas de grandes dimensões, semelhantes ao padrão descrito para os factores de *splicing* (Gama-Carvalho *et al.*, 1997), sem que, contudo, co-localizem. A recapitulação do mesmo padrão de distribuição por factores celulares distintos (topoisomerases e factores de *splicing*) sugere a ocorrência de princípios conservados na organização funcional do núcleo celular. No entanto, não é de excluir que a distribuição *spleckled* se deva ao constrangimento espacial que a acumulação de genomas, de transcritos e de proteínas virais deverá impor no interior do núcleo da célula infectada.

Suportando a hipótese de que o recrutamento das topoisomerases é funcionalmente relevante, a aplicação do ensaio *DRT* veio mostrar que as acumulações das topoisomerases junto às fábricas virais eram formadas, maioritariamente, por populações cataliticamente activas (Fig. 12). Por outro lado, o facto da inibição total da replicação viral não reduzir a importância destas acumulações sugere que a actividade e, eventualmente, o recrutamento das topoisomerases seja independente da replicação viral activa (Fig 13 B e D, e resultados não mostrados) uma realidade bem diferente da que observámos na replicação do genoma celular (Agostinho *et al.*, 2004). Assim, no nosso modelo de estudo, a distribuição intranuclear das topoisomerases deverá ser mediada pelo número de genomas virais e pela presença de complexidades topológicas, podendo envolver interacções do tipo ácido nucleico-proteína ou proteína-proteína. A diferença de comportamento das topoisomerases no modelo do adenovírus pode ainda ser justificada pelo tempo de residência nos sítios de replicação ser superior a 60 minutos (enquanto na célula de mamífero, o tempo de residência da topoisomerase II α nos focos recém-replicados é de trinta minutos) ou por participarem noutros fenómenos junto aos sítios de replicação (des/condensação do genoma viral e empacotamento).

IV.2. A mobilidade das topoisomerases I e II α é reduzida significativamente junto às fábricas virais

Os resultados imunocitoquímicos foram corroborados pelo estudo do perfil cinético das topoisomerases I e II α através da técnica de FRAP. Foi demonstrado que a mobilidade intranuclear das duas proteínas diminui junto às fábricas virais, cerca de três vezes para a topoisomerase I e de duas vezes para a topoisomerase II α (Fig. 13 A e C). O estudo cinético do mutante catalítico da Topoisomerase I (GFP-Topo I^{Y723F}) mostrou um coeficiente de difusão três vezes inferior ao da proteína *wild type* (Fig. 13 A), sugerindo que a actividade catalítica facilita a libertação da Topoisomerase I no final da reacção catalítica, como foi proposto por Christensen *et al.* (2002).

Os resultados citológicos obtidos com o ensaio *DRT* foram também confirmados por *FRAP*, depois de verificarmos que a incubação com CPT ou ETOP, reduzia os coeficientes de difusão das topoisomerases I e II α , que passavam a apresentar uma fracção imóvel na ordem dos 50% (Fig. 13 A e C). Em conjunto, estes resultados reconfirmam que as acumulações de topoisomerases junto às fábricas virais são formadas por populações cataliticamente activas. Por outro lado, a inibição da transcrição e da replicação viral não induziu alterações significativas na cinética das duas proteínas (Fig. 13 B e C), sugerindo que a manutenção das acumulações é independente daqueles fenómenos. Adicionalmente, mostrámos que as actividades catalíticas das topoisomerases I e II α eram pouco alteradas após a inibição da replicação e/ou da transcrição viral, por continuarem a mostrar uma fracção imóvel na ordem 30-40% após incubação com CPT ou ETOP, respectivamente.

IV.3. A actividade catalítica e o domínio N-terminal da topoisomerase I são essenciais para o recrutamento *in vivo*

As experiências de análise mutacional para esclarecer quais os domínios proteicos críticos no recrutamento das topoisomerases teve de cingir-se à topoisomerase I. Uma vez que as topoisomerases de tipo II actuam como dímeros, a introdução de mutantes por transfecção, com manutenção dos genes endógenos, conduz à formação de

diferentes tipos de dímeros (mutante-*wt*, *wt-wt* e mutante-mutante), o que dificulta a análise dos resultados, como anteriormente comentado (Mo & Beck, 1999).

A análise microscópica do padrão de distribuição da proteína de fusão GFP-Topo I^{Y723F} permitiu concluir que a actividade catalítica da topoisomerase I é indispensável no seu correcto recrutamento para junto das fábricas virais. Com efeito, as acumulações desta proteína mutante junto às fábricas virais nunca assumiram uma morfologia anelar e o *pool* nucleoplasmático foi observado até ao final da fase tardia de infecção (Fig. 17).

A remoção parcial ou total do domínio N-terminal modificou o recrutamento das proteínas GFP-Topo I^{Δ1-138} e GFP-Topo I^{Δ1-210}. A observação por microscopia confocal revelou um recrutamento pouco intenso destes mutantes para junto das fábricas virais e a manutenção da marcação nucleoplasmática até ao final da infecção (Fig. 17). Estas observações podem encontrar justificação nas observações *in vitro* publicadas por Lisby *et al.* (2001) e Christensen *et al.* (2003). Segundo estes investigadores, a remoção do domínio N-terminal leva a uma redução substancial da actividade de relaxamento da topoisomerase I, podendo justificar o ténue recrutamento para os domínios nucleares onde a actividade catalítica desta enzima seja necessária. Em seguida, verificámos se o domínio N-terminal isolado seria recrutado pelo adenovírus, através da transfecção da construção GFP-Topo I^{1-210wt}. O fraco recrutamento e a manutenção da marcação nucleolar e nucleoplasmática até ao final da infecção (Fig. 18, 1ª linha), sugerem que o domínio N-terminal apesar de essencial, não é suficiente para suportar o recrutamento que observámos para a topoisomerase I^{wt}. Por fim, mostrámos que a SUMOilação por SUMO-1 não parece ser uma modificação pós-traducional crítica no recrutamento da topoisomerase I para junto dos genomas virais (Fig. 18, 2ª linha). Assim e apesar de, nas células não infectadas, a conjugação com SUMO-1 mediar a exportação nucleolar da topoisomerase I, facilitando o seu recrutamento para os locais de actividade (Mo *et al.*, 2002 e Soret *et al.*, 2003), e a SUMOilação da topoisomerase IIα por SUMO-2/3 ser crítica no recrutamento desta enzima para os eixos cromossómicos durante a mitose, como foi demonstrado por nós (Agostinho *et al.*, 2008), a conjugação do domínio N-terminal com SUMO-1 não parece ser indispensável para o seu recrutamento, no modelo do adenovírus.

IV.4. As concentrações proteicas e as actividades catalíticas das topoisomerases I, II α e II β mantêm-se constantes durante a fase tardia da infecção

Apesar do adenovírus recrutar toda a proteína topoisomerásica presente na célula, esgotando os *pools* nucleoplasmáticos e nucleolares a partir das 14 horas de infecção, a tradução das topoisomerases I, II α e II β é inibida durante a infecção (Fig. 20), libertando os ribossomas para a síntese robusta de proteínas virais. Por outro lado, o adenovírus inibe a degradação das topoisomerases celulares via ubiquitina-proteossoma, mantendo as concentrações destas enzimas constantes durante a fase tardia da infecção.

A possibilidade do adenovírus resolver o número crescente de problemas topológicos através do aumento da actividade catalítica destas enzimas, foi rejeitada após a titulação da actividade de relaxamento da topoisomerase I e da actividade de decatenação das topoisomerases de tipo II se terem mostrado semelhantes em extractos nucleares não infectados e infectados (Fig. 21). Desta forma, a maior actividade catalítica e a maior concentração de topoisomerases junto às fábricas virais reflectem, essencialmente, uma redistribuição intranuclear destas enzimas durante a fase tardia da infecção. Por outro lado, estes resultados sugerem que as topoisomerases celulares não deverão ser um factor limitante na progressão da infecção viral.

IV.5. A depleção selectiva das topoisomerases I, II α e II β diminui a replicação do adenovírus

A depleção selectiva das topoisomerases I, II α ou II β por transfecção com ARNs de interferência específicos (*siRNAs*), seguida da quantificação dos genomas virais por PFGE revelou que as três enzimas são indispensáveis à progressão da infecção. Surpreendentemente, a depleção de topoisomerase I teve um efeito menor na replicação viral (-50%) do que a depleção de topoisomerase II α (-80%) ou de II β (-90%) (Fig. 24 e 25), embora a primeira enzima seja a única capaz de substituir, com sucesso, o *NFII in vitro* (Nagata *et al.*, 1983). Estes resultados são particularmente relevantes atendendo a que a topoisomerase I é mais abundante ($6,2 \times 10^5$ moléculas/núcleo) do que as topoisomerases de tipo II ($4,7-5,2 \times 10^4$ moléculas/núcleo; Meyer *et al.*, 1997).

Embora o genoma do adenovírus seja pequeno quando comparado com o genoma da célula hospedeira, estes resultados mostram que a sua replicação é mais exigente, necessitando das três topoisomerases, que não parecem ter actividades redundantes. Ao contrário do que acontece na replicação do *SV40* (Tsao *et al.*, 1993 e Simmons *et al.*, 1998), as topoisomerases de tipo II não substituem a topoisomerase I durante a replicação do adenovírus porque, possivelmente, a replicação durante a fase II é realizada cadeia-a-cadeia. Por outro lado, o facto das topoisomerases de tipo II só serem indispensáveis na replicação do adenovírus *in vivo* (Nagata *et al.*, 1983), sugere que o genoma viral apresenta fortes constrições topológicas no interior da célula. Estudos de microscopia electrónica demonstraram que o genoma do adenovírus se organiza em 8 domínios super-enrolados com forma de ansa (Wong & Hsu, 1989). Esta conformação confere ao “cromossoma” viral um aspecto de roseta, suportado por proteínas virais ancoradas à base das ansas genómicas que deverão favorecer o stresse torsional e outros problemas topológicos por inibirem a rotação das ansas genómicas virais, justificando o papel essencial das topoisomerases na infecção.

Desta forma, a observação de que o número de genomas virais presentes nas células depletadas de topoisomerases II α e II β é inferior ao número de genomas existentes nas células depletadas de topoisomerase I, pode encontrar explicação em vários cenários. Tal como na célula, as Topoisomerases de tipo II poderão participar na resolução de problemas topológicos de maior complexidade ou em eventos que se relacionam indirectamente com a replicação viral. Assim, a forte redução na replicação viral pode dever-se a uma:

- 1) redução da transcrição de proteínas celulares/virais necessárias à replicação viral ou à perversão do metabolismo celular. Esta hipótese foi parcialmente rejeitada pelos dados obtidos por *FRAP* e por não observarmos alterações nos níveis de expressão da proteína E1A, em células incubadas com dextrazoxano (50 $\mu\text{g/mL}$, 12 horas) (João Ferreira, comunicação pessoal). O dextrazoxano para além de inibir a actividade catalítica das Topoisomerases tipo II, induz a degradação da Topoisomerase II β , o que reforça o argumento desta enzima não participar na actividade transcricional de proteínas virais durante as fases precoces da infecção;

- 2) descompactação incompleta dos genomas virais antes da replicação e/ou à compactação deficiente antes da encapsidação dos genomas virais.

A evidência de que a depleção da isoforma β tem um poderoso efeito inibidor na replicação do adenovírus, foi um resultado pouco esperado tendo em conta a bibliografia publicada até à data. Com efeito, o único papel atribuído à topoisomerase II β é a regulação da expressão de genes do sistema nervoso, durante o desenvolvimento fetal. É possível que a forte inibição da replicação viral que testemunhámos tenha denunciado uma adaptação do adenovírus à célula hospedeira. O facto deste agente patogénico apresentar um forte tropismo para tecidos diferenciados (epitélios respiratório, intestinal, ocular, etc), onde a expressão da topoisomerase II β é superior à expressão da topoisomerase II α (Heck *et al.*, 1988) pode justificar os resultados observados.

IV.6. Perspectivas futuras

Os nossos resultados abrem novas perspectivas na luta contra infecções sistémicas por adenovírus, ao mostrarem que as topoisomerases celulares desempenham um papel vital no seu ciclo de vida. À semelhança das fluoroquinolonas que inibem a replicação das bactérias Gram- e Gram+ por bloquearem as actividades da ADN-girase e da topoisomerase IV bacterianas, o uso de fármacos anti-topoisomerases no tratamento de várias infecções virais (adenovírus, parvovirose canina, peritonite infecciosa felina, Herpes do tipo 1 e 2 (Advani *et al.*, 2003)), de infecções por protozoários (*Leishmania donovani* (Hanke *et al.*, 2003; Marquis *et al.*, 2003; Jean-Moreno *et al.*, 2006), *Plasmodium falciparum*, *Trichomonas vaginalis*, *Cryptosporidium parvum*) ou de infecções fúngicas (*Aspergillus*, *Cryptococcus* (Del Poeta *et al.*, 1999)) deverá apresentar grande interesse clínico. Neste contexto, os inibidores reversíveis das topoisomerases de tipo II por não apresentarem efeitos genotóxicos, poderão integrar com elevado sucesso, o arsenal de fármacos usados no combate a estas doenças.

Por outro lado, pensamos que o papel da topoisomerase II β na resolução de problemas topológicos presentes no genoma celular deverá ser reavaliado, em especial, nas células diferenciadas. Sob o ponto de vista evolutivo, o seu surgimento recente

(eucariotas superiores) e o facto de ser mais expressa que a isoforma α nos tecidos pós-mitóticos, antecipam um papel funcional relevante para esta proteína. O desenvolvimento de drogas específicas anti-topoisomerase II β deverá facilitar o estudo desta proteína e poderá otimizar o tratamento de tumores diferenciados (Alousi *et al.*, 2007). Os nossos resultados levantam ainda a hipótese dos níveis das isoformas α e β poderem vir a ser usados como factores preditivos do sucesso da viroterapia anti-tumoral.

Nos países desenvolvidos, o aumento de neoplasias nas populações humana e animal, o número crescente de casos fatais por infecções oportunistas em pacientes imuno-deficientes ou doentes transplantados e as graves consequências que as doenças parasitárias mencionadas anteriormente trazem à saúde e bem-estar animal, justificam uma aposta na investigação que aqui iniciámos e que desejamos continuar num futuro próximo.

CAPÍTULO IV

Bibliografia

V. BIBLIOGRAFIA

ADVANI, S.J., WEICHSELBAUM, R.R. & ROIZMAN B. (2003) - Herpes simplex virus 1 activates CDC2 to recruit topoisomerase II alpha for post-DNA synthesis expression of late genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8):4825-30. PMID: 12665617.

AGOSTINHO, M., SANTOS, V., FERREIRA, F., COSTA, R., CARDOSO, J., PINHEIRO, I., RINO, J., JAFFRAY, E., HAY, R.T. & FERREIRA, J. (2008) - Conjugation of human topoisomerase 2 alpha with small ubiquitin-like modifiers 2/3 in response to topoisomerase inhibitors: cell cycle stage and chromosome domain specificity. *Cancer Res.* **68**(7):2409-18.

AGOSTINHO, M., RINO, J., BRAGA, J., FERREIRA, F., STEFFENSEN, S. & FERREIRA, J. (2004) - Human topoisomerase IIalpha: targeting to subchromosomal sites of activity during interphase and mitosis. *Mol Biol Cell* **15**(5):2388-2400. PMID: 14978217.

AJUSJARVI, G. (1993) - Proteins with transcription regulatory properties encoded by human adenoviruses. *Trends in Microbiology* **1** (5):163-170. PMID: 8143133.

ALMOUZNI, G. & MÉCHALI, M. (1988) - Assembly of spaced chromatin involvement of ATP and DNA topoisomerase activity. *EMBO J* **7**(13):4355-65. PMID: 2854062.

ALOUSHI, A.M., BOINPALLY, R., WIEGAND, R., PARCHMENT, R., GADGEEL, S., HEILBRUN, L.K., WOZNIAK, A.J., DELUCA, P. & LORUSSO, P.M. (2007) - A phase 1 trial of XK469: toxicity profile of a selective topoisomerase IIbeta inhibitor. *Invest New Drugs* **25**(2):147-54. PMID: 17103044.

ALSNER, J., SVEJSTRUP, J.Q., KJELDSSEN, E., SØRENSEN, B.S. & WESTERGAARD, O. (1992) - Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function. *J Biol Chem* **267**(18):12408-11. PMID: 1319995.

ASANO, T., KLEINERMAN, E.S., ZWELLING, L.A., ZHOU, Z. & FUKUNAGA, Y. (2005) - Adenovirus-mediated human topoisomerase IIalpha gene transfer increases the sensitivity of etoposide-resistant human and mouse breast cancer cells. *Acta Oncol.* **44**(3):240-7. PMID: 16076696.

AUSTIN, C.A. & MARSH, K.L. (1998) - Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *Bioessays* **20**(3):215-26. PMID: 9631649.

AUSTIN, R.J., ORR-WEAVER, T.L. & BELL, S.P. (1999) - Drosophila ORC specifically binds to ACE3, an origin of DNA replication control element. *Genes Dev.* **13**(20):2639-49. PMID: 10541550.

AZUMA, Y., ARNAOUTO, V., ANAN, T. & DASSO, M. (2005) - PIASy mediates SUMO-2 conjugation of Topoisomerase-II on mitotic chromosomes. *EMBO J* **24**(12):2172-82. PMID: 15933717.

BAKAY, M., BÉLÁDI, I., BERENCSI, K., SIDOROVA, E., AGADZANYAN, M., FACHET, J. & ERDEI, J. (1992) - Immunoenhancement and suppression induced by adenovirus in chicken. *Acta Virol* **36**(3):269-76. PMID: 1360755.

BAKER, S.D., WADKINS, R.M., STEWART, C.F., BECK, W.T. & DANKS, M.K. (1995) - Cell cycle analysis of amount and distribution of nuclear DNA topoisomerase I as determined by fluorescence digital imaging microscopy. *Cytometry* **19**(2):134-45. PMID: 7743894.

BAUER, P.I., CHEN, H.J., KENESI, E., KENESSEY, I., BUKI, K.G., KIRSTEN, E., HAKAM, A., HWANG, J.I. & KUN, E. (2001) - Molecular interactions between poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I) and topoisomerase I (Topo I): identification of topology of binding. *FEBS Lett* **506**(3):239-42. PMID: 11602253.

BELDNER, M.A., SHERMAN, C.A., GREEN, M.R., GARRETT-MAYER, E., CHAUDHARY, U., MEYER, M.L., KRAFT, A.S. & MONTERO, A.J. (2007) - Phase I dose escalation study of vinorelbine and topotecan combination chemotherapy in patients with recurrent lung cancer. *BMC Cancer* **7**:231-245. PMID: 18096059.

BELL, S.P. & STILLMAN, B. (1992) - ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*. **357**(6374):128-34. PMID: 1579162.

BESSE, S. & PUVION-DUTILLEUL, F. (1994) - High resolution localization of replicating viral genome in adenovirus-infected HeLa cells. *Eur J Cell Biol*. **63**(2):269-79.

BHARTI, A.K., OLSON, M.O., KUFE, D.W. & RUBIN, E.H. (1996) - Identification of a nucleolin binding site in human topoisomerase I. *J Biol Chem* **271**(4):1993-7. PMID: 8567649.

BLOW, J.J. & LASKEY, R.A. (1986) - Initiation of DNA replication in nuclei and purified DNA by a cell-free extract of *Xenopus* eggs. *Cell* **47**(4):577-87. PMID: 3779837.

BODNAR, J.W., HANSON, P.I., POLVINO-BODNAR, M., ZEMPSKY, W. & WARD, D.C. (1989) - The terminal regions of adenovirus and minute virus of mice DNAs are preferentially associated with the nuclear matrix in infected cells. *J Virol* **63**(10):4344-53. PMID: 2778878.

BOTTING, C.H. & HAY, R.T. (1999) - Characterization of the adenovirus preterminal protein and its interaction with the POU homeodomain of NFIII (Oct-1). *Nucleic Acids Res* **27**(13):2799-805. PMID: 10373599.

BRAGA, J., DESTERRO, J.M. & CARMO-FONSECA, M. (2004) - Intracellular macromolecular mobility measured by fluorescence recovery after photobleaching with confocal laser scanning microscopes. *Mol Biol Cell* **15**(10):4749-60. PMID: 15292455.

BROWN, D.T., WESTPHAL, M., BURLINGHAM, B.T., WINTERHOFF, U. & DOERFLER, W. (1975) - Structure and composition of the adenovirus type 2 core. *J Virol* **16**(2):366-87. PMID: 1152144.

CALAPEZ, A., PEREIRA, H.M., CALADO, A., BRAGA, J., RINO, J., CARVALHO, C., TAVANEZ, J.P., WAHLE, E., ROSA, C. & CARMO-FONSECA, M. (2002) - The intranuclear mobility of messenger RNA binding proteins is ATP dependent and temperature sensitive. *J Cell Biol* **159**(5):795-805. PMID: 12473688.

CAPRANICO, G., FERRI, F., FOGLI, M.V., RUSSO, A., LOTITO, L. & BARANELLO, L. (2007) - The effects of camptothecin on RNA polymerase II transcription: roles of DNA topoisomerase I. *Biochimie*. **89**(4):482-9. PMID: 17336444.

CARPENTER, A.J. & PORTER, A.C. (2004) - Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase IIalpha mutant human cell line. *Mol Biol Cell* **15**(12):5700-11. PMID: 15456904.

CASTAÑO, I.B., BRZOSKA, P.M., SADOFF, B.U., CHEN, H. & CHRISTMAN, M.F. (1996) - Mitotic chromosome condensation in the rDNA requires TRF4 and DNA topoisomerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**(20):2564-76. PMID: 8895658.

CHALLBERG, M.D., DESIDERIO, S.V. & KELLY, T.J. (1980) - Adenovirus DNA replication in vitro: characterization of a protein covalently linked to nascent DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(9):5105-9. PMID: 6933548.

CHAMPOUX, J.J. (1988) - Topoisomerase I is preferentially associated with isolated replicating simian virus 40 molecules after treatment of infected cells with camptothecin. *J Virol* **62**(10):3675-83. PMID: 2843668.

CHAMPOUX, J.J. (2001) - DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**:369-413. PMID: 11395412.

CHEN, A.Y. & LIU, L.F. (1994) - Design of topoisomerase inhibitors to overcome MDR1-mediated drug resistance. *Adv Pharmacol* **29**:245-56. PMID: 8996611.

CHIKAMORI, K., GRABOWSKI, D.R., KINTER, M., WILLARD, B.B., YADAV, S., AEBERSOLD, R.H., BUKOWSKI, R.M., HICKSON, I.D., ANDERSEN, A.H., GANAPATHI, R. & GANAPATHI, M.K. (2003) - Phosphorylation of serine 1106 in the catalytic domain of topoisomerase II alpha regulates enzymatic activity and drug sensitivity. *J Biol Chem* **278**(15):12696-702. PMID: 12569090.

CHOW, L.T., ROBERTS, J.M., LEWIS, J.B. & BROKER, T.R. (1977) - A map of cytoplasmic RNA transcripts from lytic adenovirus type 2, determined by electron microscopy of RNA:DNA hybrids. *Cell* **11**(4):819-36. PMID: 890740.

CHOW, K.C. & PEARSON, G.D. (1985) - Adenovirus infection elevates levels of cellular topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **82**(8):2247-51. PMID: 2986107

CHRISTENSEN, M.O., BARTHELMES, H.U., BOEGE, F. & MIELKE, C. (2003) - Residues 190-210 of human topoisomerase I are required for enzyme activity in vivo but not in vitro. *Nucleic Acids Res* **15**;31(24):7255-63. PMID: 14654701.

CHRISTENSEN, M.O., BARTHELMES, H.U., FEINEIS, S., KNUDSEN, B.R., ANDERSEN, A.H., BOEGE, F. & MIELKE, C. (2002a) - Changes in mobility account for camptothecin-induced subnuclear relocation of topoisomerase I. *J Biol Chem* **277**(18):15661-5. PMID: 11907023.

CHRISTENSEN, M.O., KROKOWSKI, R.M., BARTHELMES, H.U., HOCK, R., BOEGE, F. & MIELKE, C. (2004) - Distinct effects of topoisomerase I and RNA polymerase I inhibitors suggest a dual mechanism of nucleolar/nucleoplasmic partitioning of topoisomerase I. *J Biol Chem* **279**(21):21873-82. PMID: 15014084.

CHRISTENSEN, M.O., LARSEN, M.K., BARTHELMES, H.U., HOCK, R., ANDERSEN, C.L., KJELDSSEN, E., KNUDSEN, B.R., WESTERGAARD, O., BOEGE, F. & MIELKE, C. (2002b) - Dynamics of human DNA topoisomerases II α and II β in living cells. *J Cell Biol* **157**(1):31-44. PMID: 11927602.

CHUNG, T.D., DRAKE, F.H., TAN, K.B., PER, S.R., CROOKE, S.T. & MIRABELLI, C.K. (1989) - Characterization and immunological identification of cDNA clones encoding two human DNA topoisomerase II isozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23):9431-5. PMID: 2556712.

CLASSEN, S., OLLAND, S. & BERGER, J.M. (2003) - Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19):10629-34. PMID: 12963818.

COBB, J., REDDY, R.K., PARK, C. & HANDEL, M.A. (1997) - Analysis of expression and function of topoisomerase I and II during meiosis in male mice. *Mol Reprod Dev*. **46**(4):489-98. PMID: 9094096.

COOK, J.L., LEWIS, J.R., KLIMKAIT, T., KNUST, B., DOERFLER, W. & WALKER TA. (1988) - In vivo evolution of adenovirus 2-transformed cell virulence associated with altered E1A gene function. *Virology* **163**(2):374-90. PMID: 2965448.

CORBETT, K.D. & BERGER, J.M. (2004) - Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. **33**:95-118. PMID: 15139806.

CRISONA, N.J., STRICK, T.R., BENSIMON, D., CROQUETTE, V.C. & COZZARELLI, N.R. (2000) - Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by E. coli topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes Dev* **14**(22):2881-92. PMID: 11090135.

CUVIER, O. & HIRANO, T. (2003) - A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. *J Cell Biol* **160**(5):645-55. PMID: 12604590.

D'ARPA, P., BEARDMORE, C. & LIU, L.F. (1990) - Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Res* **50**(21):6919-24. PMID: 1698546.

D'ARPA, P., MACHLIN, P.S., RATRIE, H., ROTHFIELD, N.F., CLEVELAND, D.W. & EARNSHAW, W.C. (1988) - cDNA cloning of human DNA topoisomerase I: catalytic activity of a 67.7-kDa carboxyl-terminal fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(8):2543-7. PMID: 2833744.

DE JONG, J.C., WERMENBOL, A.G., VERWEIJ-UIJTERWAAL, M.W., SLATERUS, K.W., WERTHEIM- van DILLEN, P., van DOORNUM, G.J., KHOO, S.H. & HIERHOLZER, J.C. (1999) - Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* **37**(12):3940-5. PMID: 10565911.

DEKKER, J., KANELLOPOULOS, P.N., LOONSTRA, A.K., Van OOSTERHOUT, J.A., LEONARD, K., TUCKER, P.A. & van der VLIET, P.C. (1997) - Multimerization of the adenovirus DNA-binding protein is the driving force for ATP-independent DNA unwinding during strand displacement synthesis. *EMBO J* **16**(6):1455-63. PMID: 9135160.

DEL POETA, M., TOFFALETTI, D.L., RUDE, T.H., DYKSTRA, C.C., HEITMAN, J. & PERFECT, J.R. (1999) - Topoisomerase I is essential in *Cryptococcus neoformans*: role in pathobiology and as an antifungal target. *Genetics* **152**(1):167-78. PMID: 10224251.

DOBBELSTEIN, M. (2004) - Replicating adenoviruses in cancer therapy. *Curr Top Microbiol Immunol*. **273**:291-334. PMID: 14674605.

DRAKE, F.H., ZIMMERMAN, J.P., MCCABE, F.L., BARTUS, H.F., PER, S.R., SULLIVAN, D.M., ROSS, W.E., MATTERN, M.R., JOHNSON, R.K. & CROOKE, S.T. (1987) - Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme. *J Biol Chem* **262**(34):16739-47. PMID: 2824504.

DUCREUX, M.P., BOIGE, V., LEBoulLEUX, S., MALKa, D., KERGOAT, P., DROMAIN, C., ELIAS, D., DE BAERE, T., SABOURIN, J.C., DUVILLARD, P., LASSER, P., SCHLUMBERGER, M. & BAUDIN E. (2006) - A phase II study of irinotecan with 5-fluorouracil and leucovorin in patients with pretreated gastroenteropancreatic well-differentiated endocrine carcinomas. *Oncology* **70**(2):134-40. PMID: 16645326.

DUGUET, M. (1997) - When helicase and topoisomerase meet! *J Cell Sci* **110**(12):1345-50. PMID: 9217320.

ELAZHARY, M.A., DEA, S., MITTAL, K.R. & HIGGINS, R. (1985) - Prevalence of Antibodies to Swine Influenza Virus, Porcine Adenovirus Type 4 and *Haemophilus pleuropneumoniae* in Quebec Pig Farms with Respiratory Problems. *Can Vet J* **26**(6):190-192. PMID: 17422542.

FARRE, L., RIGAU, T., MOGAS, T., GARCÍA-ROCHA, M., CANAL, M., GOMEZ-FOIX, A.M. & RODRÍGUEZ-GIL, J.E. (1999) - Adenovirus-mediated introduction of DNA into pig sperm and offspring. *Mol Reprod Dev* **53**(2):149-58. PMID: 10331453.

FENNELL, D.A., STEELE, J.P., SHAMASH, J., EVANS, M.T., WELLS, P., SHEAFF, M.T., RUDD, R.M. & STEBBING, J. (2007) - Efficacy and safety of first- or second-line irinotecan, cisplatin, and mitomycin in mesothelioma. *Cancer* **109**(1):93-9. PMID: 17146783.

FERREIRA, J. & CARMO-FONSECA, M. (1997) - Genome replication in early mouse embryos follows a defined temporal and spatial order. *J Cell Sci* **110**(7):889-97. PMID: 9133676.

FERREIRA, J., PAOLELLA, G., RAMOS, C. & LAMOND, A.I. (1997) - Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. *J Cell Biol* **139**(7):1597-610. PMID: 9412456.

FORREST, G. (2004) - Gastrointestinal infections in immunocompromised hosts. *Curr Opin Gastroenterol* **20**(1):16-21. PMID: 15703615.

FOX, M.H., ARNDT-JOVIN, D.J., JOVIN, T.M., BAUMANN, P.H. & ROBERT-NICOUD, M. (1991) - Spatial and temporal distribution of DNA replication sites localized by immunofluorescence and confocal microscopy in mouse fibroblasts. *J Cell Sci* **99**(2):247-53. PMID: 1885669.

FREDMAN, J.N. & ENGLER, J.A. (1993) - Adenovirus precursor to terminal protein interacts with the nuclear matrix in vivo and in vitro. *J Virol* **67**(6):3384-95. PMID: 8497057.

FRIEDMAN, H.S., KEIR, S.T. & HOUGHTON, P.J. (2003) - The emerging role of irinotecan (CPT-11) in the treatment of malignant glioma in brain tumors. *Cancer* **97**(9 Suppl):2359-62. PMID: 12712457.

FRØHLICH, R.F., VEIGAARD, C., ANDERSEN, F.F., MCCLENDON, A.K., GENTRY, A.C., ANDERSEN, A.H., OSHEROFF, N., STEVNSNER, T. & KNUDSEN, B.R. (2007) - Tryptophane-205 of human topoisomerase I is essential for camptothecin inhibition of negative but not positive supercoil removal. *Nucleic Acids Res* **35**(18):6170-80. PMID: 17827209.

GAMA-CARVALHO, M., KRAUSS, R.D., CHIANG, L., VALCÁRCEL, J., GREEN, M.R. & CARMO-FONSECA, M. (1997) - Targeting of U2AF65 to sites of active splicing in the nucleus. *J Cell Biol* **137**(5):975-87. PMID: 9166400.

GASSER, S.M., LAROCHE, T., FALQUET, J., BOY DE LA TOUR, E. & LAEMMLI, U.K. (1986) - Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *J Mol Biol* **188**(4):613-29. PMID: 3016287.

GELLERT, M., MIZUUCHI, K., O'DEA, M.H. & NASH, H.A. (1976) - DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(11):3872-6. PMID: 186775.

- GERME, T. & HYRIEN, O. (2005) - Topoisomerase II-DNA complexes trapped by ICRF-193 perturb chromatin structure. *EMBO Rep* **6**(8):729-35. PMID: 16025133.
- GINSBERG, H.S. & YOUNG, C.S. (1976) - Genetics of adenoviruses. *Adv Cancer Res* **23**:91-130. PMID: 775934.
- GOGEV, S., GEORGIN, J.P., SCHYNTS, F., VANDERPLASSCHEN, A. & THIRY, E. (2004) - Bovine herpesvirus 1 glycoprotein D expression in bovine upper respiratory tract mediated by a human adenovirus type 5. *Vet Res* **35**(6):715-21. PMID: 15535961.
- GOSWAMI, P.C., SHEREN, J., ALBEE, L.D., PARSIAN, A., SIM, J.E., RIDNOUR, L.A., HIGASHIKUBO, R., GIUS, D., HUNT, C.R. & SPITZ, D.R. (2000) - Cell cycle-coupled variation in topoisomerase IIalpha mRNA is regulated by the 3'-untranslated region. Possible role of redox-sensitive protein binding in mRNA accumulation. *J Biol Chem* **275**(49):38384-92. PMID: 10986283.
- GRUE, P., GRÄSSER, A., SEHESTED, M., JENSEN, P.B., UHSE, A., STRAUB, T., NESS, W. & BOEGE, F. (1998) - Essential mitotic functions of DNA topoisomerase IIalpha are not adopted by topoisomerase IIbeta in human H69 cells. *J Biol Chem* **273**(50):33660-6. PMID: 9837951.
- HALUSKA, P. & RUBIN, E.H. (1998) - A role for the amino terminus of human topoisomerase I. *Adv Enzyme Regul* **38**:253-62. PMID: 9762357.
- HAN, J.Y., LIM, H.S., PARK, Y.H., LEE, S.Y. & LEE, J.S. (2007) - Integrated pharmacogenetic prediction of irinotecan pharmacokinetics and toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Chemother* **19**(6):724-30. PMID: 18230557.
- HANKE T, RAMIRO MJ, TRIGUEROS S, ROCA J & LARRAGA V. (2003) - Cloning, functional analysis and post-transcriptional regulation of a type II DNA topoisomerase from *Leishmania infantum*. A new potential target for anti-parasite drugs. *Nucleic Acids Res* **31**(16):4917-28. PMID: 12907735.
- HASSAN, A.B., ERRINGTON, R.J., WHITE, N.S., JACKSON, D.A. & COOK, P.R. (1994) - Replication and transcription sites are colocalized in human cells. *J Cell Sci* **107**(2):425-34. PMID: 7515893.
- HASINOFF, B.B., SCHNABL, K.L., MARUSAK, R.A., PATEL, D. & HUEBNER, E. (2003) - Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against doxorubicin by preventing damage to mitochondria. *Cardiovasc Toxicol* **3**(2):89-99. PMID: 14501028.
- HASINOFF, B.B., TAKEDA, K., FERRANS, V.J. & YU, Z.X. (2002) - The doxorubicin cardioprotective agent dexrazoxane (ICRF-187) induces endopolyploidy in rat neonatal myocytes through inhibition of DNA topoisomerase II. *Anticancer Drugs* **13**(3):255-8. PMID: 11984069.
- HATFIELD, L. & HEARING, P. (1993) - The NFIII/OCT-1 binding site stimulates adenovirus DNA replication in vivo and is functionally redundant with adjacent sequences. *J Virol* **67**(7):3931-9. PMID: 8510211.

- HAU, P.M., SIU, W.Y., WONG, N., LAI, P.B. & POON, R.Y. (2006) - Polyploidization increases the sensitivity to DNA-damaging agents in mammalian cells. *FEBS Lett* **580**(19):4727-36. PMID: 16887121.
- HAY, R.T. (1985) - The origin of adenovirus DNA replication: minimal DNA sequence requirement in vivo. *EMBO J* **4**(2):421-6. PMID: 4018031.
- HECK, M.M. & EARNSHAW, W.C. (1986) - Topoisomerase II: A specific marker for cell proliferation. *J Cell Biol* **103**(6):2569-81. PMID: 3025219.
- HECK, M.M., HITTELMAN, W.N. & EARNSHAW, W.C. (1988) - Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(4):1086-90. PMID: 2829215.
- HILLEMAN, M.R. & WERNER, J.H. (1954) - Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med* **85**(1):183-8. PMID: 13134329.
- HOZÁK, P., JACKSON, D.A. & COOK, P.R. (1994) - Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle. *J Cell Sci* **107**(8):2191-202. PMID: 7983177.
- HSIANG, Y.H., HERTZBERG, R., HECHT, S. & LIU, L.F. (1985) - Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* **260**(27):14873-8. PMID: 2997227.
- HUGHES, T.A., POMBO, A., MCMANUS, J., HOZÁK, P., JACKSON, D.A. & COOK, P.R. (1995) - On the structure of replication and transcription factories. *J Cell Sci* **19**:59-65. PMID: 8655648.
- ISHIDA, R., TAKASHIMA, R., KOUJIN, T., SHIBATA, M., NOZAKI, N., SETO, M., MORI, H., HARAGUCHI, T. & HIRAOKA, Y. (2001) - Mitotic specific phosphorylation of serine-1212 in human DNA topoisomerase II α . *Cell Struct Funct* **26**(4):215-26. PMID: 11699638.
- JEAN-MORENO, V., ROJAS, R., GOYENECHE, D., COOMBS, G.H. & WALKER, J. (2006) - Leishmania donovani: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. *Exp Parasitol*. **112**(1):21-30. PMID: 16293247.
- JENSEN, L.H., NITISS, K.C., ROSE, A., DONG, J., ZHOU, J., HU, T., OSHEROFF, N., JENSEN, P.B., SEHESTED, M. & NITISS, J.L. (2000) - A novel mechanism of cell killing by anti-topoisomerase II bisdioxopiperazines. *J Biol Chem* **275**(3):2137-46. PMID: 10636919.
- KIM, R.A. & WANG, J.C. (1989) - Function of DNA topoisomerases as replication swivels in Saccharomyces cerevisiae. *J Mol Biol* **208**(2):257-67. PMID: 2549254.

- KIMURA, K., SAIJO, M., UI, M. & ENOMOTO, T. (1994) - Growth state- and cell cycle-dependent fluctuation in the expression of two forms of DNA topoisomerase II and possible specific modification of the higher molecular weight form in the M phase. *J Biol Chem* **269**(2):1173-6. PMID: 8288578.
- KNIPE, D., HOWLEY, M., GRIFFIN, D. & LAMB, R. (2007) - Fields in Virology, 5ª edição, Lippincott Williams & Wilkins. ISSN:0781760607.
- KONDAPI, A.K., SATYANARAYANA, N. & SAIKRISHNA, A.D. (2006) - A study of the topoisomerase II activity in HIV-1 replication using the ferrocene derivatives as probes. *Arch Biochem Biophys* **450**(2):123-32. PMID: 16712776.
- KOSTENCE, S., KOUDSTAAL, W., SPRANGERS, M., WEVERLING, G.J., PENDERS, G., HELMUS, N., VOGELS, R., BAKKER, M., BERKHOUT, B., HAVENGA, M. & GOUDSMIT, J. (2004) - Adenovirus types 5 and 35 seroprevalence in AIDS risk groups supports type 35 as a vaccine vector. *AIDS* **18**(8):1213-6. PMID: 15166541.
- KRIESER, R.J., MACLEA, K.S., PARK, J.P. & EASTMAN, A. (2001) - The cloning, genomic structure, localization, and expression of human deoxyribonuclease IIbeta. *Gene* **269**(1-2):205-16. PMID: 11376952.
- LABOURIER, E., ROSSI, F., GALLOUZI, I.E., ALLEMAND, E., DIVITA, G. & TAZI, J. (1998) - Interaction between the N-terminal domain of human DNA topoisomerase I and the arginine-serine domain of its substrate determines phosphorylation of SF2/ASF splicing factor. *Nucleic Acids Res* **26**(12):2955-62. PMID: 9611241.
- LAINE, J.P., OPRESKO, P.L., INDIG, F.E., HARRIGAN, J.A., VON KOBBE, C. & BOHR, V.A. (2003) - Werner protein stimulates topoisomerase I DNA relaxation activity. *Cancer Res* **63**(21):7136-46. PMID: 14612507.
- LARSEN, A.K., ESCARGUEIL, A.E. & SKLADANOWSKI, A. (2003) - From DNA damage to G2 arrest: the many roles of topoisomerase II. *Prog Cell Cycle Res* **5**:295-300. PMID: 14593724.
- LE GOFF, F., MEDERLE, I., GIRARD-MISGUICH, F. & LANGLOIS, P. (2003) - Preliminary data of adenovirus CELO localisation in chicken. *Br Poult Sci* **44**(5):823-4. PMID: 14965138.
- LEBEL, M., SPILLARE, E.A., HARRIS, C.C. & LEDER, P. (1999) - The Werner syndrome gene product co-purifies with the DNA replication complex and interacts with PCNA and topoisomerase I. *J Biol Chem* **274**(53):37795-9. PMID: 10608841.
- LEE, M.S., WANG, J.C. & BERAN, M. (1992) - Two independent amsacrine-resistant human myeloid leukemia cell lines share an identical point mutation in the 170 kDa form of human topoisomerase II. *J Mol Biol* **223**(4):837-43. PMID: 1311390.
- LEPPARD, J.B. & CHAMPOUX, J.J. (2005) - Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma* **114**(2):75-85. PMID: 15830206.

LIM, W.T., BAGGSTROM, M.Q., READ, W., FRACASSO, P.M. & GOVINDAN, R. (2007) - A Phase I trial of weekly docetaxel and topotecan for solid tumors. *Acta Oncol* **25**:1-5. PMID: 17896192.

LINKA, R.M., PORTER, A.C., VOLKOV, A., MIELKE, C., BOEGE, F. & CHRISTENSEN, M.O. (2007) - C-terminal regions of topoisomerase IIalpha and IIbeta determine isoform-specific functioning of the enzymes in vivo. *Nucleic Acids Res* **35**(11):3810-22. PMID: 17526531.

LISBY, M., OLESEN, J.R., SKOUBOE, C., KROGH, B.O., STRAUB, T., BOEGE, F., VELMURUGAN, S., MARTENSEN, P.M., ANDERSEN, A.H., JAYARAM, M., WESTERGAARD, O. & KNUDSEN, B.R. (2001) - Residues within the N-terminal domain of human topoisomerase I play a direct role in relaxation. *J Biol Chem* **276**(23):20220-7. PMID: 11283003.

LIU, L.F. & WANG, J.C. (1987) - Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(20):7024-7. PMID: 2823250.

LUCAS, I., GERME, T., CHEVRIER-MILLER, M. & HYRIEN O. (2001) - Topoisomerase II can unlink replicating DNA by precatenane removal. *EMBO J.* **20**(22):6509-19. PMID: 11707421.

LYU, Y.L., LIN, C.P., AZAROVA, A.M., CAI, L., WANG, J.C. & LIU, L.F. (2006) - Role of topoisomerase IIbeta in the expression of developmentally regulated genes. *Mol Cell Biol* **26**(21):7929-41. PMID: 16923961.

MA, Y. & MATHEWS, M.B. (1996) - Structure, function, and evolution of adenovirus-associated RNA: a phylogenetic approach. *J Virol.* **70**(8):5083-99. PMID: 8764016.

MAO, Y., DESAI, S.D., TING, C.Y., HWANG, J. & LIU, L.F. (2001) - 26 S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes. *J Biol Chem* **276**(44):40652-8. PMID: 11546768.

MAO, Y., MEHL, I.R. & MULLER, M.T. (2002) - Subnuclear distribution of topoisomerase I is linked to ongoing transcription and p53 status. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3):1235-40. PMID: 11805286.

MARQUIS, J.F., MAKHEY, D., LAVOIE, E.J. & OLIVIER, M. (2003) - Effects of topoisomerases inhibitors protoberberine on *Leishmania donovani* growth, macrophage function, and infection. *J Parasitol* **89**(5):1048-52. PMID: 14627155.

MAXWELL, A. & GELLERT, M. (1986) - Mechanistic aspects of DNA topoisomerases. *Adv Protein Chem* **38**:69-107. PMID: 3026152.

MAZOYER, E., DAUGAS, E., VERINE, J., PILLEBOUT, E., MOURAD, N., MOLINA, J.M. & GLOTZ, D. (2008) - A case report of adenovirus-related acute interstitial nephritis in a patient with AIDS. *Am J Kidney Dis* **51**(1):121-6. PMID: 18155541.

- MCCLENDON, A.K., RODRIGUEZ, A.C. & OSHEROFF, N. (2005) - Human topoisomerase II α rapidly relaxes positively supercoiled DNA: implications for enzyme action ahead of replication forks. *J Biol Chem* **280**(47):39337-45. PMID: 16188892.
- MCPHERSON, J.P. & GOLDENBERG, G.J. (1998) - Induction of apoptosis by deregulated expression of DNA topoisomerase II α . *Cancer Res* **58**(20):4519-24. PMID: 9788593.
- MESELSON, M. & STAHL, F.W. (1958) – The replication of DNA in *Escherichia Coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**(7):671-82. PMID: 16590258.
- MEYER, K.N., KJELDSSEN, E., STRAUB, T., KNUDSEN, B.R., HICKSON, I.D., KIKUCHI, A., KREIPE, H. & BOEGE, F. (1997) - Cell cycle-coupled relocation of types I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities. *J Cell Biol* **136**(4):775-88. PMID: 9049244.
- MIELKE, C., CHRISTENSEN, M.O., BARTHELMES, H.U. & BOEGE, F. (2004) - Enhanced processing of UVA-irradiated DNA by human topoisomerase II in living cells. *J Biol Chem* **279**(20):20559-62. PMID: 15044480.
- MIRSKI, S.E., GERLACH, J.H. & COLE, S.P. (1999) - Sequence determinants of nuclear localization in the α and β isoforms of human topoisomerase II. *Exp Cell Res* **251**(2):329-39. PMID: 10471318.
- MO, Y.Y. & BECK, W.T. (1999) - Association of human DNA topoisomerase II α with mitotic chromosomes in mammalian cells is independent of its catalytic activity. *Exp Cell Res* **252**(1):50-62. PMID: 10502399.
- MO YY, WANG, C. & BECK, W.T. (2000) - A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* **275**(52):41107-13. PMID: 11016921.
- MONDAL, N., ZHANG, Y., JONSSON, Z., DHAR, S.K., KANNAPIRAN, M. & PARVIN, J.D. (2003) - Elongation by RNA polymerase II on chromatin templates requires topoisomerase activity. *Nucleic Acids Res* **31**(17):5016-24. PMID: 12930951.
- MONTECUCCO, A., ROSSI, R., FERRARI, G., SCOVASSI, A.I., PROSPERI, E. & BIAMONTI, G. (2001) - Etoposide induces the dispersal of DNA ligase I from replication factories. *Mol Biol Cell* **12**(7):2109-18. PMID: 11452007.
- MORHAM, S.G., KLUCKMAN, K.D., VOULOMANOS, N. & SMITHIES, O. (1996) - Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection. *Mol Cell Biol* **16**(12):6804-9. PMID: 8943335.
- MUL, Y.M. & van der VLIET, P.C. (1992) - Nuclear factor I enhances adenovirus DNA replication by increasing the stability of a preinitiation complex. *EMBO J* **11**(2):751-60. PMID: 1537346.

NAGATA, K., GUGGENHEIMER, R.A. & HURWITZ, J. (1983) - Adenovirus DNA replication in vitro: synthesis of full-length DNA with purified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(14):4266-70. PMID: 6308611.

NARITA, M., YAMADA, M., TSUBOI, T. & KAWASHIMA, K. (2003) - Bovine adenovirus type 3 pneumonia in dexamethasone-treated calves. *Vet Pathol* **40**(2):128-35. PMID: 12637751.

NATALE, D.A., LI, C.J., SUN, W.H. & DEPAMPHILIS ML. (2000) - Selective instability of Orc1 protein accounts for the absence of functional origin recognition complexes during the M-G(1) transition in mammals. *EMBO J.* **19**(11):2728-38. PMID: 10835370.

NEGRI, C., CHIESA, R., CERINO, A., BESTAGNO, M., SALA, C., ZINI, N., MARALDI, N.M. & ASTALDI RICOTTI, G.C. (1992) - Monoclonal antibodies to human DNA topoisomerase I and the two isoforms of DNA topoisomerase II: 170- and 180-kDa isozymes. *Exp Cell Res* **200**(2):452-9. PMID: 1315288.

NIIMI, A., SUKA, N., HARATA, M., KIKUCHI, A. & MIZUNO, S. (2001) - Co-localization of chicken DNA topoisomerase IIalpha, but not beta, with sites of DNA replication and possible involvement of a C-terminal region of alpha through its binding to PCNA. *Chromosoma* **110**(2):102-14. PMID: 11453553.

NISHITANI, H., LYGEROU, Z., NISHIMOTO, T. & NURSE, P. (2000) - The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* **404**(6778):625-8. PMID: 10766248.

O'BRIEN, M., ECKARDT, J. & RAMLAU, R. (2007) - Recent advances with topotecan in the treatment of lung cancer. *Oncologist* **12**(10):1194-204. PMID: 17962613.

O'KEEFE, R.T., HENDERSON, S.C. & SPECTOR, D.L. (1992) - Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *J Cell Biol* **116**(5):1095-110. PMID: 1740468.

PIZZOLATO, J.F. & SALTZ, L.B. (2003) - The camptothecins. *Lancet* **361**(9376):2235-42. PMID: 12842380.

POMBO A., FERREIRA, J., BRIDGE, E. & CARMO-FONSECA, M. (1994) - Adenovirus replication and transcription sites are spatially separated in the nucleus of infected cells. *EMBO J.* **13**(21):5075-85. PMID: 7957073.

POMMIER, Y., KOHLHAGEN, G., WU, C. & SIMMONS, D.T. (1998) - Mammalian DNA topoisomerase I activity and poisoning by camptothecin are inhibited by simian virus 40 large T antigen. *Biochemistry* **37**(11):3818-23. PMID: 9521701.

- POOT, R.A., BOZHENOK, L., van der BERG, D.L., STEFFENSEN, S., FERREIRA, F., GRIMALDI, M., GILBERT, N., FERREIRA, J. & VARGA-WEISZ PD. (2004) - The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci. *Nat Cell Biol* **6**(12):1236-44. PMID: 15543136.
- PUVION-DUTILLEUL, F., & PICHARD, E. (1992) - Segregation of viral doublestranded and single-stranded DNA molecules in nucleic of adenovirus infected cells as revealed by electron microscope *in situ* hybridization. *Biol. Cell* **76**:139–150.
- RALLABHANDI, P., HASHIMOTO, K., MO, Y.Y., BECK, W.T., MOITRA, P.K. & D'ARPA, P. (2002) - Sumoylation of topoisomerase I is involved in its partitioning between nucleoli and nucleoplasm and its clearing from nucleoli in response to camptothecin. *J Biol Chem* **277**(42):40020-6. PMID: 12149243.
- REDINBO, M.R., STEWART, L., KUHN, P., CHAMPOUX, J.J. & HOL, W.G. (1998) - Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* **279**(5356):1504-13. PMID: 9488644.
- ROSSI, F., LABOURIER, E., FORNÉ, T., DIVITA, G., DERANCOURT, J., RIOU, J.F., ANTOINE, E., CATHALA, G., BRUNEL, C. & TAZI, J. (1996) - Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* **381**(6577):80-2. PMID: 8609994.
- ROWE, W.P., HUEBNER, R.J., GILMORE, L.K., PARROTT, R.H. & WARD, T.G. (1953) - Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* **84**(3):570-3. PMID: 13134217.
- SADOFF, B.U., HEATH-PAGLIUSO, S., CASTAÑO, I.B., ZHU, Y., KIEFF, F.S. & CHRISTMAN, M.F. (1995) - Isolation of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* requiring DNA topoisomerase I. *Genetics* **141**(2):465-79. PMID: 8647385.
- SALAS, M. (1991) - Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem.* **60**:39-71. PMID: 1883199
- SAKAGUCHI, A. & KIKUCHI, A. (2004) - Functional compatibility between isoform alpha and beta of type II DNA topoisomerase. *J Cell Sci* **117**(Pt 7):1047-54. PMID: 14996935.
- SCHAACK, J., HO, W.Y., FREIMUTH, P. & SHENK, T. (1990a) - Adenovirus terminal protein mediates both nuclear matrix association and efficient transcription of adenovirus DNA. *Genes Dev* **4**(7):1197-208. PMID: 2210375.
- SCHAACK, J., SCHEDL, P. & SHENK, T. (1990b) - Topoisomerase I and II cleavage of adenovirus DNA in vivo: both topoisomerase activities appear to be required for adenovirus DNA replication. *J Virol* **64**(1):78-85. PMID: 2152835.

SCHAAK, J., SCHEDL, P. & SHENK T. (1990) - Transcription of adenovirus and HeLa cell genes in the presence of drugs that inhibit topoisomerase I and II function. *Nucleic Acids Res* **18**(6):1499-508. PMID: 2158079.

SCHOEFFLER, A.J. & BERGER, J.M. (2005) - Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 6):1465-70. PMID: 16246147.

SCHVARTZMAN, J.B. & STASIAK, A. (2004) - A topological view of the replicon. *EMBO Rep* **5**(3):256-61. PMID: 14993926.

SIMMONS, D.T., ROY, R., CHEN, L., GAI, D. & TROWBRIDGE PW. (1998) - The activity of topoisomerase I is modulated by large T antigen during unwinding of the SV40 origin. *J Biol Chem* **273**(32):20390-6. PMID: 9685392.

SINGH, G., JAYANARAYAN, K.G. & DEY, C.S. (2005) - Novobiocin induces apoptosis-like cell death in topoisomerase II over-expressing arsenite resistant *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **141**(1):57-69. PMID: 15811527.

SLATTER, M.A., READ, S., TAYLOR, C.E., CROOKS, B.N., ABINUN, M., FLOOD, T.J., CANT, A.J., WRIGHT, C. & GENNERY, A.R. (2005) - Adenovirus type F subtype 41 causing disseminated disease following bone marrow transplantation for immunodeficiency. *J Clin Microbiol* **43**(3):1462-4. PMID: 15750134.

STAKER, B.L., HJERRILD, K., FEESE, M.D., BEHNKE, C.A., BURGIN, A.B. & STEWART L. (2002) - The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24):15387-92. PMID: 12426403.

STEWART, L., IRETON, G.C. & CHAMPOUX, J.J. (1996) - The domain organization of human topoisomerase I. *J Biol Chem* **271**(13):7602-8. PMID: 8631794.

STEWART, L., IRETON, G.C. & CHAMPOUX, J.J. (1997) - Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. *J Mol Biol* **269**(3):355-72. PMID: 9199405.

STEWART, L., IRETON, G.C. & CHAMPOUX, J.J. (1999) - A functional linker in human topoisomerase I is required for maximum sensitivity to camptothecin in a DNA relaxation assay. *J Biol Chem* **274**(46):32950-60. PMID: 10551862.

STILLMAN, B.W., LEWIS, J.B., CHOW, L.T., MATHEWS, M.B. & SMART, J.E. (1981) - Identification of the gene and mRNA for the adenovirus terminal protein precursor. *Cell* **23**(2):497-508. PMID: 7471210.

STRICK, R., STRISSEL, P.L., GAVRILOV, K. & LEVI-SETTI, R. (2001) - Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *J Cell Biol* **155**(6):899-910. PMID: 11739403.

STUKENBERG, P.T., TURNER, J. & O'DONNELL, M. (1994) - An explanation for lagging strand replication: polymerase hopping among DNA sliding clamps. *Cell* **78**(5):877-87. PMID: 8087854.

SUZUKI, H.I., ASAI, T., OKADA, K., KAZUYAMA, Y., TAKAHASHI, T., KANDA, Y., CHIBA, S. & KUROKAWA, M. (2008) - Disseminated Adenovirus Disease by Multiple Adenovirus Serotypes following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **14**(3):353-355. PMID: 18275903.

TAAGEPERA, S., RAO, P.N., DRAKE, F.H. & GORBSKY, G.J. (1993) - DNA topoisomerase II alpha is the major chromosome protein recognized by the mitotic phosphoprotein antibody MPM-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18):8407-11. PMID: 7690961.

TAMANOI, F. & STILLMAN, B.W. (1982) - Function of adenovirus terminal protein in the initiation of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(7):2221-5. PMID: 6954537.

TRENTIN, J.J., YABE, Y. & TAYLOR, G. (1962) - The quest for human cancer viruses. *Science* **137**:835-41. PMID: 13922417.

TSAO, Y.P., RUSSO, A., NYAMUSWA, G., SILBER, R. & LIU, L.F. (1993) - Interaction between replication forks and topoisomerase I-DNA cleavable complexes: studies in a cell-free SV40 DNA replication system. *Cancer Res* **53**(24):5908-14. PMID: 8261402.

TSUTSUI, K.M., SANO, K., HOSOYA, O. & TSUTSUI, K. (2006) - Expression dynamics and functional implications of DNA topoisomerase II beta in the brain. *Anat Sci Int* **81**(3):156-63. PMID: 16955666.

TSUTSUI, K., TSUTSUI, K., SANO, K., KIKUCHI, A. & TOKUNAGA, A. (2001) - Involvement of DNA topoisomerase IIbeta in neuronal differentiation. *J Biol Chem* **276**(8):5769-78. PMID: 11106659.

TUCKER, P.A., TSERNOGLOU, D., TUCKER, A.D., COENJAERTS, F.E., LEENDERS, H. & van der VLIET, P.C. (1994) - Crystal structure of the adenovirus DNA binding protein reveals a hook-on model for cooperative DNA binding. *EMBO J* **13**(13):2994-3002. PMID: 8039495.

TURLEY, H., COMLEY, M., HOULBROOK, S., NOZAKI, N., KIKUCHI, A., HICKSON, I.D., GATTER, K. & HARRIS, A.L. (1997) - The distribution and expression of the two isoforms of DNA topoisomerase II in normal and neoplastic human tissues. *Br J Cancer* **75**(9):1340-6. PMID: 9155056.

UGGLA, B., MÖLLGÅRD, L., STÅHL, E., MOSSBERG, L.L., KARLSSON, M.G., PAUL, C. & TIDEFELT, U. (2001) - Expression of topoisomerase IIalpha in the G0/G1 cell cycle phase of fresh leukemic cells. *Leuk Res* **25**(11):961-6. PMID: 11597731.

WANG, J.C. (1985) - DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **54**:665-97. PMID: 2992360.

WANG, J.C. (1996) - DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **65**:635-92. PMID: 8811192.

WANG, J.C. (2002) - Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(6):430-40. PMID: 12042765.

WANG, J.C. & DEPEW, D.E. (1975) - Conformational fluctuations of DNA helix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(11):4275-9. PMID: 172901.

WASSERMAN, R.A., AUSTIN, C.A., FISHER, L.M. & WANG, J.C. (1993) - Use of yeast in the study of anticancer drugs targeting DNA topoisomerases: expression of a functional recombinant human DNA topoisomerase II alpha in yeast. *Cancer Res* **53**(15):3591-6. PMID: 8393377.

WATSON, J.D. & CRICK, F.H. (1953) - Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**(4356):737-8. PMID: 13054692.

WILLEMS, L., LAGRANGE-XELOT, M., GALLIEN, S., ROBIN, M., SCIEUX, C., SOCIE, G. & MOLINA, J.M. (2007) - Successful outcome of a disseminated adenovirus infection 6 years after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **40**(10): 989-993. PMID: 18026146.

WILSTERMANN, A.M., BENDER, R.P., GODFREY, M., CHOI, S., ANKLIN, C., BERKOWITZ, D.B., OSHEROFF, N. & GRAVES, D.E. (2007) - Topoisomerase II - drug interaction domains: identification of substituents on etoposide that interact with the enzyme. *Biochemistry* **46**(28):8217-25. PMID: 17580961.

WOESSNER, R.D., CHUNG, T.D., HOFMANN, G.A., MATTERN, M.R., MIRABELLI, C.K., DRAKE, F.H. & JOHNSON, R.K. (1990) - Differences between normal and ras-transformed NIH-3T3 cells in expression of the 170kD and 180kD forms of topoisomerase II. *Cancer Res* **50**(10):2901-8. PMID: 2159365.

WONG, M.L. & HSU, M.T. (1989) - Linear adenovirus DNA is organized into supercoiled domains in virus particles. *Nucleic Acids Res* **17**(9):3535-50. PMID: 2726486.

WONG, M.L. & HSU, M.T. (1990) - Involvement of topoisomerases in replication, transcription, and packaging of the linear adenovirus genome. *J Virol* **64**(2):691-9. PMID: 2153235.

YANG, X., LI, W., PRESCOTT, E.D., BURDEN, S.J. & WANG, J.C. (2000) - DNA topoisomerase IIbeta and neural development. *Science* **287**(5450):131-4. PMID: 10615047.

ZHOU, Z., ZWELLING, L.A., GANAPATHI, R. & KLEINERMAN, E.S. (2001) - Enhanced etoposide sensitivity following adenovirus-mediated human topoisomerase IIalpha gene transfer is independent of topoisomerase IIbeta. *Br J Cancer* **85**(5):747-51. PMID: 11531262.